

**Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta**

**Biologie
Fyziologie živočichů**



Bc. Daniel Divín

Zánětem vyvolané změny v expresi kanabinoidních receptorů v ptačím mozku

Inflammation-associated changes in cannabinoid receptor expression in avian brain

Diplomová práce

Školitel: doc. RNDr. Michal Vinkler, Ph.D.

Praha, 2020

Prohlášení o samostatném vypracování práce

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně s použitím uvedených zdrojů. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 10.8 2020

Poděkování

Rád bych poděkoval mému školiteli Michalu Vinklerovi za poskytnuté rady při psaní této práce, Mercedes Góméz za velkou pomoc při prvních krocích v laboratoři, a všem členům ze skupiny Evoluční a ekologické imunologie, kteří se podíleli na experimentech a odběrech vzorků. Dalé také děkuji rodině za oporu při studiu.

Abstrakt (CZ)

Výzkum vzájemného propojení nervového a imunitního systému je dnes zaměřen převážně na savce, kdežto u ostatních obratlovců, včetně ptáků, je poměrně zanedbáván. Součástí nervového a imunitního systému jsou také kanabinoidní receptory, které jsou dvojího typu: CB₁, podílející se u savců na regulaci nervových procesů a CB₂, podílející se u savců na regulaci imunologických procesů. Málo se toho ví o funkci těchto receptorů v nervových a především imunitních procesech u ptáků. Proto se tato práce věnuje expresi kanabinoidních receptorů u kognitivně pokročilých druhů ptáků (papoušci, pěvci) v průběhu indukovaného sterilního peritoneálního zánětu. Papoušci zřejmě na rozdíl od pěvců postrádají funkční gen pro CB₂, což může mít vliv na regulaci zánětlivých procesů. Naše výsledky ukázaly, že se exprese kanabinoidních receptorů působením peritoneálního zánětu výrazně nemění ani u papoušků, ani u pěvců. U papoušků se ovšem zvyšuje exprese prozánětlivého cytokinu IL-1 β v mozku, čímž se u nich potvrzuje význam neuroimunitní interakce. Tato práce tak naznačuje, že i u ptáků je centrální nervová soustava ovlivněna zánětem skrze osu střevo-mozek, a že exprese kanabinoidních receptorů se při zánětu příliš nemění. Jejich role v neuroimunitní regulaci tak je pravděpodobně nevýznamná.

Klíčová slova: neuroimunologie, ptačí imunologie, kanabinoidní receptory, neurogenní zánět, osa střevo-mozek

Abstract (EN)

Research in interactions between the nervous and immune systems is focused mainly on mammals, while in other vertebrates, including birds, it remains neglected. Two types of cannabinoid receptors interconnect the nervous and immune systems: CB₁, which is in mammals involved in regulation of neural processes, and CB₂, which is in mammals involved in regulation of immune processes. However, little is presently known about the roles of these receptors in nervous and especially immune processes in birds. Therefore, in this work I focus on the expression of cannabinoid receptors in cognitively advanced bird species (parrots, passerines) during induced sterile peritoneal inflammation. Unlike passerines, parrots appear to lack the gene for CB₂, which may affect the inflammation regulation. I have revealed no changes in the expression of these receptors during peritoneal inflammation neither in parrots, nor in songbirds. Nevertheless, the increase in expression of the proinflammatory cytokine IL-1 β in the brain in parrots confirms the importance of neuroimmune interaction and mutual influences along the gut-brain axis. This work suggests that even in birds, the central nervous system is affected by inflammation through the gut-brain axis. The expression of cannabinoid receptors does not change much during inflammation. Their role in neuroimmune regulation is thus probably insignificant.

Key words: neuroimmunology, avian immunology, cannabinoid receptors, neurogenic inflammation, gut-brain axis

Obsah

Prohlášení o samostatném vypracování práce	ii
Poděkování.....	iii
Abstrakt (CZ)	iv
Abstract (EN).....	v
1. Úvod	1
1.1. Neuroimunitní interakce	1
1.1.1. Neuroimunitní systém a střevní mikrobiota	2
1.2. Zánět a jeho regulace	3
1.2.1. Úloha IL-1 β v zánětu	4
1.3. Endokanabinoidní systém	5
1.3.1. Úvod do endokanabinoidního systému	5
1.3.2. Vliv endokanabinoidního systému na kognitivní funkce	8
1.3.3. Vliv endokanabinoidního systému na imunitní systém	9
1.3.4. Význam endokanabinoidního systému v gastrointestinálním traktu	10
2. Cíle diplomové práce.....	12
3. Materiál a metody	13
3.1. Modelové organismy	13
3.2. Průběh experimentů a odběr vzorků	13
3.3. Návrh primerů pro sekvenaci CNR genů	15
3.4. Sekvence CNR genů a návrh RT-qPCR primerů	18
3.5. Extrakce DNA z gelu pro sekvenaci CNR2	21
3.6. Měření exprese kanabinoidních receptorů pomocí RT-qPCR	21
3.7. Výpočet relativní kvantifikace	23
3.8. Měření exprese IL-1 β	23
3.9. Statistické analýzy	25
4. Výsledky	26
4.1. CNR geny v genomu zebřiček a papoušků	26
4.2. Exprese vybraných genů po stimulaci LPS u papoušků	28
4.3. Exprese vybraných genů po stimulaci LPS u zebřiček	32
5. Diskuse	38
6. Závěr	42
7. Seznam zkratk	43
8. Literatura.....	44
9. Přílohy.....	53

1. Úvod

Všichni čelistnatí obratlovci (Gnathostomata) mají vyvinutý imunitní systém schopný vrozené (přírozené) i adaptivní obrany (Bird et al. 2002). Nejlépe je imunitní systém prozkoumán u savců. V reakci na otázku konzervativnosti imunitních genů mezi všemi obratlovci se funkce imunitních genů zkoumají i u ostatních skupin obratlovců, převážně u hospodářsky významných zvířat, včetně ptáků (Bird et al. 2002). Ptáci většinou žijí v podobném prostředí a sdílí podobné patogeny jako savci, proto u nich dochází ke konvergentním adaptacím, a to i v rámci imunitního systému (Shultz and Sackton 2019). Nicméně můžeme narazit na rozdíly v genové výbavě a funkčnosti homologních imunitních genů (Shultz and Sackton 2019). Převážně u člověka, ale i u jiných savců se v dnešní době intenzivně zkoumá propojení nervové soustavy, imunitní soustavy a vnitřní mikrobioty a to v souvislosti s rozvojem neurologických poruch, které mohou vznikat díky nerovnováze mezi těmito složkami. Tato nerovnováha u zvířat i člověka vzniká působením stresu, infekce, špatné kondice, nebo také civilizačními faktory (antibiotika, nadbytek potravy, nepřírozené osvětlení), které vedou ke vzniku chronických zánětů. Zatím málo se toho ví o neuroimunitních interakcích a vlivu mikrobioty na imunitu a chování u jiných obratlovců. Tato práce se zabývá expresí a propojením vybraných imunitně a fyziologicky významných genů u kognitivně pokročilých ptáků (papoušci, pěvci), konkrétně prozánětlivého cytokinu IL-1 β a kanabinoidních receptorů a snaží se porovnat současné poznatky o těchto genech a jejich funkcích mezi savci a ptáky.

1.1. Neuroimunitní interakce

Nervový a imunitní systém se historicky považovaly za dva oddělené systémy, které spolu příliš nesouvisí, především díky existenci hematoencefalické bariéry. Nyní se ovšem na tyto dvě soustavy spolu s endokrinní soustavou pohlíží jako na propojené a spolupracující celky, které se mohou navzájem doplňovat a ovlivňovat (Procaccini et al. 2014). Dokládat nám to může i lidový poznatek, že psychický stav člověka ovlivňuje imunitu a průběh nemocí, který byl již v minulosti potvrzen například objevením působení produktů stresové osy na imunitní buňky (Rogers, Dubey, and Reich 1979; Kook et al. 1995). V nervové soustavě se nacházejí receptory pro mediátory imunitní soustavy: cytokiny, a naopak na imunitních buňkách mohou být exprimovány receptory pro neurotransmitery, neuropeptidy a hormony (Phelps 2008). Například hlavní prozánětlivé cytokiny interleukin 1 α (IL-1 α) a interleukin 1 β (IL-1 β) mají svůj receptor v různých částech mozku (hipokampus, *raphe nuclei*, chloroidní plexus, purkyňovy buňky mozečku, *eminentia mediana* a přední lalok hypofýzy) a je pravděpodobně schopen

modulovat stresovou osu (HPA, tedy hypotalamus - hypofýza - nadledviny) na úrovni mozku (Cunningham et al. 1992). Ví se, že leukocyty (například paměťové $CD4^+$ T lymfocyty) mohou migrovat skrze cirkumventrikulární oblasti (tedy oblasti se sníženou hematoencefalickou bariérou) do centrální nervové soustavy (CNS) a mozkomíšního moku (CSF), kde jsou dokonce detekovatelné hladiny cytokinů (Watkins, Maier, and Goehler 1995; Ransohoff, Kivisäkk, and Kidd 2003). Produkty leukocytů mají vliv na HPA osu a také na tvorbu pohlavních hormonů. Naopak hormony HPA osy (glukokortikoidy) a pohlavní hormony uvolňované v různém množství i například v různých fázích ovariálního cyklu ovlivňují funkci leukocytů (Chryssikopoulos 1997). Již zmiňovaný IL- 1β v hypotalamu (který se zde může během infekce exprimovat) indukuje výlev hormonu uvolňujícího kortikotropin (CRH), čímž zvyšuje hladinu adrenokortikotropního hormonu (ACTH) působícího při stresové reakci (Berkenbosch et al. 1987; Kelley and McCusker 2014). IL- 1β může být kromě leukocytů uvolňován i některými buňkami v nervové soustavě, například mikroglie, nebo astrocyty (Giulian 1986; Procaccini et al. 2014). Na aferentních neuronech můžeme najít receptory pro prozánětlivé cytokiny (IL- 1β , TNF α), jejichž aktivace může vést k neurálnímu reflexu tlumící imunitní reakci, například aktivace bloudivého nervu (nervus vagus) způsobuje opoždění imunitní reakce na bakteriální lipopolysacharid (LPS). Uvolněný acetylcholin opoždí uvolňování primárních prozánětlivých cytokinů (TNF α , IL- 1β , IL-6) u aktivovaných makrofágů. Opoždění může způsobit i agonista acetylcholinových receptorů nikotin (Borovikova et al. 2000; Saeed et al. 2005). Kromě toho můžeme na leukocytech najít i receptory pro katecholaminy, které mohou ovlivňovat chemotaxi, cytotoxickou aktivitu, proliferaci nebo vypouštění cytokinů, a některé další neuropeptidy, které mohou pro leukocyty fungovat jako chemoatraktanty a jejich řízené periferní vypouštění v určitém místě může vést k migraci leukocytů do dané oblasti a vzniku lokální reakce, která se nazývá neurogenní zánět (Madden 2003).

1.1.1. Neuroimunitní systém a střevní mikrobiota

Nervový systém jakožto hlavní řídicí soustava živočichů se v menší či větší míře podílí na kontrole funkcí všech orgánů, včetně orgánů trávicí soustavy. Ve střevech tak dochází k významné interakci mezi nervovým systémem, imunitním systémem a zde žijícími mikroorganismy. Přirozené symbiotické a komenzální bakterie a ostatní mikroorganismy můžeme souhrnně nazvat střevní mikrobiota. S těmito mikroorganismy živočichové prodělali společný vývoj a jsou již nedílnou součástí trávicí soustavy živočichů, kde se podílí mimo jiné na udržování střevní homeostázy, podpoře trávení (především u býložravců jako jsou přežvýkavci nebo u xylofágních organismů jako jsou termiti), podpoře imunity a v poslední

době se ukazuje, že i na regulaci chování (Maranduba et al. 2015). Kontrola trávicí soustavy centrální nervovou soustavou probíhá přes bloudivý nerv (nervus vagus) a jeho různé větve. Tomuto systému se říká osa střevo-mozek (gut-brain axis) a jde tedy o systém skládající se z nervových a humorálních drah spojujících centra v nervové soustavě se střevem (Vanner et al. 2016; Acharya et al. 2017). Zároveň se tak dá snadno monitorovat střevní prostředí, které je neustále v kontaktu s antigeny, a regulovat odpovědi: sekreci, motilitu, přítok krve. Kontrola probíhá jak eferentně tak aferentně, čili informace z trávicí soustavy se mohou přenášet i do CNS, kde se vyhodnotí potřebná regulace. Bloudivý nerv tedy poskytuje i informace ze střeva do mozku. Mikroorganismy produkují biologicky aktivní látky (serotonin, kanabinoidy, organické kyseliny), které ovlivňují imunitní buňky i buňky CNS. Produkty střevní mikrobioty tak mohou působit i na aktivitu bloudivého nervu a modulovat tak aferentní signál a chování aktivací interakce mezi *locus coeruleus* a předním mozkem vedoucí k produkci faktoru uvolňujícího kortikotropin (CRF). HPA signalizace pak vede k uvolňování kortikosteroidů, které například tlumí imunitní reakce (Silverman and Sternberg 2012). U mastocytů kortizol, či kortikosteron inhibuje uvolňování histaminu. U T lymfocytů glukokortikoidy tlumí expresi IL-4, IL-5 a IL-13. To vede k ustanovení rovnováhy, při které nedochází ke zbytečné imunitní odpovědi proti mikroorganismům přirozeně žijícím v trávicí soustavě živočichů. Infekce, stresové podněty, nebo antibiotika ovlivňují množství a složení bakterií a způsobují dysbiózu, nerovnováhu mezi mikrobiotou a nervovým a imunitním systémem, která může vést ke změně gastrointestinální neuroimunitní odpovědi a indukci zánětu (Vagnerová et al. 2019). Tyto faktory se tak mohou podílet na vzniku chronických zánětlivých onemocnění. Mimo jiné také může docházet ke změnám exprese některých genů, jejichž produkty se podílí na regulaci imunity, například cytokinů, nebo kanabinoidních receptorů (Aguilera, Vergara, and Martínez 2013).

1.2. Zánět a jeho regulace

Zánět je fyziologická reakce na porušení integrity, která je způsobená poškozením či působením nějaké noxy (škodliviny, například patogenním organismem), vedoucí k opravě a ochraně organismu (Ryan and Majno 1977; Hořejší et al. 2017). Příznaky zánětu byly popsány již ve starověku jako otok, zčervenání, zvýšená místní teplota a bolestivost. Po detekci škodliviny následuje sekvenční vylévání zánětlivých mediátorů a aktivace imunitních buněk, tedy především leukocytů. Mediátory zánětu mohou být cytokiny a chemokiny produkované různými typy buněk, nejen těmi imunitními. V místě zánětu dochází ke zvýšené mikrocirkulaci a propustnosti cév, čímž dochází k exudaci tekutiny do tkání. Dále dochází ke zvýšené

adhezivitě leukocytů na povrch cév, přičemž cytokiny mohou zvyšovat expresi adhezních molekul. Například TNF α a IL-1 β zvyšují expresi selektinů. Jejich exprese může být stimulovaná i například působením bakteriálního lipopolysacharidu (Meager 1999). Po přichycení na povrch cévního endotelu leukocyty infiltrují do poškozené tkáně a pomocí chemotaxe se dostávají do místa zánětu. Chemotaktickými mediátory jsou chemokiny (skupina cytokinů s chemotaktickou funkcí), které rekrutují specifickou populaci leukocytů podle potřeby – existují různé typy chemokinů, lákající různé typy leukocytů (Smith et al. 1997). Například chemokin IL-8 je produkován mnoha buněčnými typy včetně epiteliálních buněk, fibroblastů, makrofágů, T buněk, endoteliálních buněk a neutrofilů. Chemotaktický je hlavně pro neutrofile, ale také bazofily a T buňky (Smith et al. 1997). Lokální akumulace tekutiny a krevních buněk způsobuje otok. Bílé krvinky v místě zánětu ničí patogeny různými způsoby: fagocytózou, degranulací enzymů (hydrolázy, fosfatázy, peroxidázy), zahájením oxidačního vzplanutí, při němž za zvýšené spotřeby kyslíku, dochází k tvorbě jeho reaktivních forem (například H₂O₂), dále také produkcí pyrogenních cytokinů a endogenních pyrogenů (prostaglandiny) přenastavující termoregulační centrum v hypotalamu, čímž dochází ke zvýšení tělesné teploty (Ryan and Majno 1977). Všechny zánětlivé procesy musí být přísně regulovány, nejen v průběhu zánětu aby nedošlo k přehnané, nebo naopak moc slabé reakci na škodlivý podnět, ale aby reakce byla adekvátní danému podnětu, tak musí regulace také zajistit ukončení procesu zánětu, aby nevznikl zánět chronický (Smith et al. 1997). Cytokiny mohou dále aktivovat leukocyty a směřovat k dalším zánětlivým reakcím spouštěním signálních drah vedoucích k expresi prozánětlivých mediátorů, například NF- κ B nebo JAK/STAT signalizací (Hanada and Yoshimura 2002).

1.2.1. Úloha IL-1 β v zánětu

Jednou z hlavních prozánětlivých skupin cytokinů je rodina IL-1, která svým působením indukuje výlev dalších cytokinů a mediátorů tvořící jakousi prozánětlivou síť (Rider et al. 2011). Rodina IL-1, nebo homology daných cytokinů lze nalézt v rámci celé linie obratlovců (Bird et al. 2002). Majoritní členové této rodiny IL-1 α a IL-1 β mají pleiotropní efekt na více buněčných typů a hrají klíčovou roli v akutním i chronickém zánětu (Ren and Torres 2009). Na rozdíl od IL-1 α , který funguje jako spouštěč zánětu, když aktivuje transkripci chemokinů (IL-8) a dalších cytokinů (IL-6, IFN- γ), funguje IL-1 β spíše v pozdějších fázích již rozvinuté zánětlivé odpovědi jako amplifikátor zánětu (Werman et al. 2004; Rider et al. 2011). Je sekretován mnoha buněčnými typy od keratinocytů, fibroblastů, endoteliálních buněk, přes imunitní buňky (NK buňky, lymfocyty, makrofágy, mastocyty, mikroglie) a glie (Schwanovy

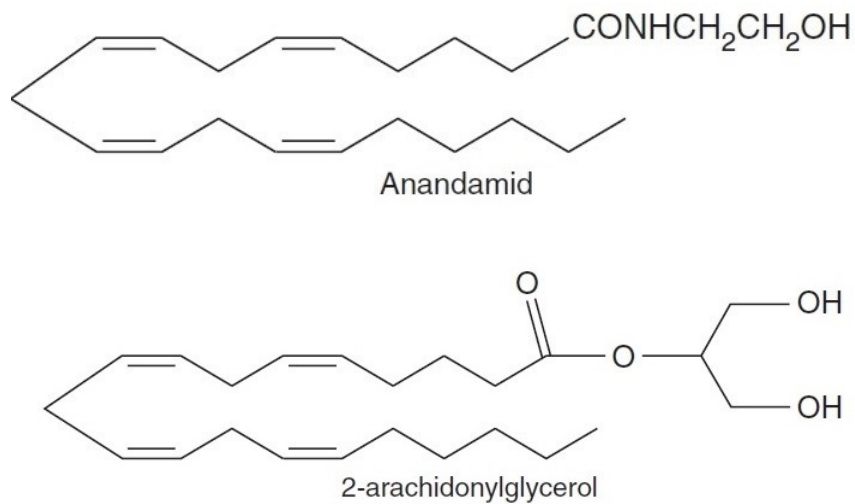
buňky, astrocyty) (Bird et al. 2002; Ren and Torres 2009). IL-1 β je aktivní pouze po jeho sestřihu z prekursoru kaspázou-1 na inflamazómu. Kaspáza-1 je v příslušných buňkách uvedena v činnost působením zánětlivého agens, například LPS. Při imunitní reakci jsou první buňky sekretující IL-1 β aktivované monocyty, které uvolňují ATP do extracelulárního prostoru. To se váže na purinergní receptory, což vede ke snížení intracelulární hladiny draslíku. V reakci na to dochází k oligomerizaci inflamazomu a aktivaci kaspázy-1 uvnitř lysozomu, kde se zároveň nachází prekursor IL-1 β : pro-IL-1 β . Ten je nastřižen a následně sekretován (Andrei et al. 2004; Dinarello 2011). IL-1 β v rámci svého zánětlivého působení také aktivuje cyklooxygenázu a dochází tak ke vzniku pro-nociceptivních mediátorů (vytváří se prostaglandin E2) (Ren and Torres 2009). IL-1 β tak působí jako hyperalgesický (zesilující bolest) a termický agens. Kromě zánětu, bolesti a autoimunitních onemocnění se podílí i na některých homeostatických funkcích – regulace spánku, příjmu potravy, tělesné teploty (Ren and Torres 2009). IL-1 β signalizuje skrze MyD88 a NF- κ B dráhy, čímž indukuje transkripci dalších prozánětlivých genů (Rider et al. 2011). Exprese IL-1 β vede k expresi specifických chemokinů, což koreluje s pozdější migrací makrofágů do místa zánětu, ke zvýšení počtu CD4⁺ T buněk a podílí se také na diferenciaci Th17 buněk (Ben-Sasson et al. 2009).

1.3. Endokanabinoidní systém

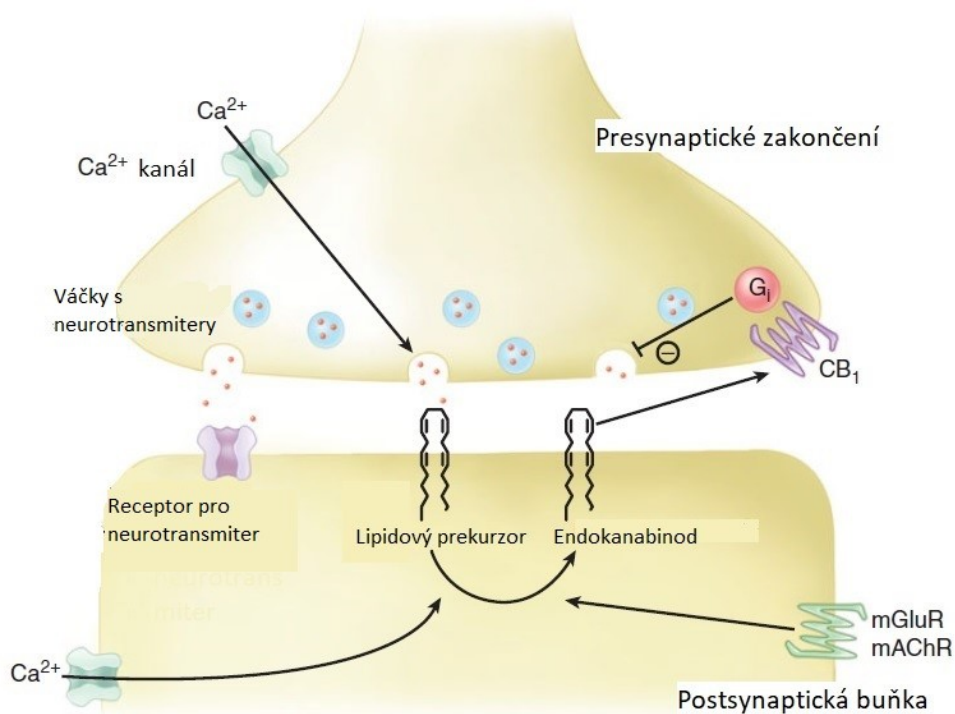
1.3.1. Úvod do endokanabinoidního systému

Endokanabinoidní systém (ECS) je označení pro skupinu molekul a struktur, nacházející se v tělech živočichů, které souvisejí se signalizací a metabolismem kanabinoidů, a které mají vliv na určité fyziologické funkce. ECS se skládá z kanabinoidních receptorů, ligandů kanabinoidních receptorů (kanabinoidů) a enzymů ovlivňujících syntézu a degradaci kanabinoidů. Kanabinodini receptory (CB) jsou receptory spřažené s G-proteiny, které mají sedm transmembránových podjednotek a vážou se s rodinou G_{i/o} α podjednotkou, inhibující adenylát cyklázu a napětově ovládané Ca²⁺ kanály a aktivující K⁺ kanály (Nestler 2009). Existují 2 typy těchto receptorů: CB₁ (kódovaný genem *CNR1*), který je u savců exprimován především v nervové soustavě (v centrální i periferní části) a CB₂ (kódovaný genem *CNR2*) exprimován u savců hlavně v imunitních buňkách. Na základě sekvenční podobnosti se jedná o paralogy vzniklé duplikací již u společných předků obratlovců, proto je můžeme nalézt v rámci celé linie obratlovců (Elphick 2012). U bezobratlých existují pro kanabinoidní receptory jiné geny, které nejsou homologické s těmi obratlovčími, přičemž hmyz a pravděpodobně celá linie Ecdysozoa receptory pro kanabinoidy postrádá úplně (McPartland et al. 2001; Elphick 2012). Nejvyšší hustota CB₁ receptorů byla v savčím mozku nalezena

v amygdale, hipokampu, mozečku, bazálních gangliích a v mozkové kůře (M. Herkenham et al. 1990). V ptačím mozku je exprese CB₁ na stejných místech jako v mozku savčím, a proto se předpokládá konzervovanost tohoto systému (Stincic and Hyson 2008). Pomocí autoradiografie byla u andulek vlnkovaných (*Melopsittacus undulatus*) zjištěna nejvyšší hustota CB₁ receptorů v rámci CNS v mozečku, bazálních gangliích a dále také v *nucleus taenie* (homolog savčí amygdaly) a hipokampu (Alonso-Ferrero et al. 2006). Kanabinoidní receptory jsou tedy spojovány s regulací emocí, paměti, motoriky a pocitů převážně tlumivým efektem retrogradní signalizací (viz Obrázek č. 2.). Ta probíhá tak, že při akčním potenciálu vede depolarizace na membráně neuronu ke vtoku Ca²⁺, který aktivuje enzymy syntetizující kanabinoidy z membránových fosfolipidů na postsynaptické straně. Ty se váží na CB receptory na presynaptické straně. Aktivovaný G_{i/o}α protein inhibuje napětově ovládané Ca²⁺ kanály a ztěžuje tak vylití neurotransmiteru na synapsi. Tomuto procesu se říká presynaptická inhibice (Maresz et al. 2005; Nestler 2009). V menší míře se CB₁ i CB₂ receptory vyskytují také v nadledvinách, srdci, plicích, slinivce, děloze a ve varlatech (Galiègue et al. 1995). Přírodní ligandy obou těchto receptorů jsou endokanabinoidy (viz Obrázek č. 1.), které jsou syntetizovány z mastných kyselin membránových fosfolipidů (Lu and Mackie 2016). Mezi fyziologicky nejvýznamnější patří anandamid (N-arachidonoyl ethanolamin; AEA) a 2-arachidonoylglycerol (2-AG). Agonisté kanabinoidních receptorů jsou také exokanabinoidy, například Δ⁹-THC (tetrahydrokanabinol) z konopí setého (*Cannabis sativa*). Kromě regulace v CNS a imunitních funkcí má kanabinoidní systém velkou roli v gastrointestinálním traktu, kde se ve spolupráci se střevní mikrobiotou podílí na příjmu potravy, chuti k jídlu, střevní motilitě a metabolismu (Cristino, Becker, and Di Marzo 2014; Cani et al. 2016; Greenwood-Van Meerveld 2017). Kanabinoidní receptory také ovlivňují jádra v hypothalamu regulující příjem potravy a to převážně anabolicky, tedy směrem k ukládání energie (zvýšení apetitu, lipogenese) (Cristino, Becker, and Di Marzo 2014). Velmi vyvinutý endokanabinoidní systém mají kloubní spojení (Krustev, Muley, and McDougall 2017). Důležitým enzymem, který se podílí na degradaci endokanabinoidů, je FAAH (fatty acid amide hydrolase) (Nestler 2009).



Obrázek č. 1.: Nejčastější endokanabinoidy



Obrázek č. 2.: Mechanismus působení endokanabinoidů na synapsi. Při depolarizaci se na postsynaptickém zakončení pod vlivem vápenatých iontů začnou syntetizovat endokanabinoidy z lipidových membránových prekursorů, které zpětně inhibují výlev neurotransmiteru na presynaptické straně. Upraveno dle Nestler 2009.

1.3.2. Vliv endokanabinoidního systému na kognitivní funkce

Bylo již řečeno, že se kanabinoidní receptory vyskytují v oblastech mozku, jako jsou bazální ganglia, mozeček, amygdala nebo hipokampus, což jsou centra pro různé kognitivní funkce (M. Herkenham et al. 1990; M. Herkenham 1992). CB₁ je široce exprimovaný hlavně v předním mozku a kůře (M Herkenham et al. 1991; Tsou et al. 1998). Vyskytuje se na tělech, dendritech i axonech GABAergních neuronů, u nichž ovlivňuje výlev neurotransmiteru (Tsou et al. 1998; Domenici 2006). Agonisté CB₁ receptorů působí u GABAergních neuronů v korové oblasti předního mozku tlumícím efektem, tedy snížením výlevu neurotransmiteru (Domenici 2006). Snížený výlev neurotransmiterů v mozkové kůře může mít vliv na kognitivní a exekutivní funkce, jako je paměť, pozornost, plánování (Pattij, Wiskerke, and Schoffelmeer 2008). Součástí basálních ganglií je mimo jiné i žíhané těleso (*corpus striatum*), jehož projekční neurony se podílejí na syntéze některých neuropeptidů (dynorfin, substance P a enkefalin). U CB₁ deficientních jedinců myši došlo ke zvýšené produkci těchto neuropeptidů, což se projevilo na změnách chování – snížená lokomoční, motorická aktivita a vyhledávací chování. CB₁ receptory tedy mohou tonicky inhibovat tyto neurony a snižovat produkci daných neuropeptidů (Steiner et al. 1999). U ptáků, konkrétně u zebřiček (*Taeniopygia guttata*) je prozkoumán vliv kanabinoidního systému na vývoj mozkových oblastí zpěvu a tedy vývoje zpěvu (Ken Soderstrom and Tian 2006). Během vývoje se v období učení zpěvu a motorických schopností zvyšuje počet CB₁ receptorů a během dospělosti se jejich počet snižuje v oblastech středního mozku (K. Soderstrom and Tian 2006). Změny v expresi CB₁ se mohou u savců i ptáků projevovat změnami v daných kognitivních schopnostech zahrnující učení (K. Soderstrom and Johnson 2000; K. Soderstrom and Johnson 2003) a paměť, včetně procesu dlouhodobé potenciace (Shiflett et al. 2004). Předpokládá se, že vystavování se kanabinoidům a tedy nadměrná aktivace kanabinoidních receptorů může vést k psychiatrickým poruchám a onemocněním (Krebs, Kebir, and Jay 2019). Změna ve funkci CB₁ má velkou roli například na některé symptomy Parkinsonovy choroby (zhoršená paměť a motorická koordinace) (Ceccarini et al. 2019). Kanabinoidní receptory se také hojně nacházejí v hypothalamu, tedy hlavnímu integračnímu centru, které mimo jiné ovlivňuje i energetickou homeostázu. Na tu působí kanabinoidní receptory převážně anabolickým efektem – zvyšují apetit a motivaci k příjmu potravy, podporuje lipogenní procesy a směřuje ukládání glukózy do jater (Silvestri and Di Marzo 2013; Cristino, Becker, and Di Marzo 2014). Exprese CB₁ receptorů v adenohipofýze u krys je ovlivněná pohlavím a pohlavními hormony. *CNR1* geny obsahují vazebné místo pro pohlavní hormony, které tak mohou ovlivňovat jejich expresi (González et

al. 2000). Větší míru exprese CB₁ receptorů mají samci. U samic exprese fluktuuje v závislosti na fázi ovariálního cyklu, kdy nejvyšší hodnoty byly naměřeny druhý den diestru a nejnižší během estru. Stejně tak fluktuuje i hladina endokanabinoidů (konkrétně anandamidu), která je nejvyšší během estrální fáze (González et al. 2000). U zebřiček ovlivňuje CB₁ sociální a rozmnožovací chování. Sociálně dominantnější samci mají vyšší míru exprese CB₁, což také pozitivně koreluje s agonistickým chováním (hnízdící samci vyhánějí jiné samce) (DeVries et al. 2016).

1.3.3. Vliv endokanabinoidního systému na imunitní systém

Kanabinoidní receptory druhého typu se u savců vyskytují převážně v imunitních buňkách a podílí se na imunomodulaci (Klein et al. 2003; Maresz et al. 2005). Typicky jsou exprimovány v NK buňkách, T i B lymfocytech, makrofázích a v rámci CNS v mikroglíích (Galiègue et al. 1995; Carlisle et al. 2002). V klidových makrofázích je míra exprese CB₂ receptorů velmi malá. V aktivovaných makrofázích roste, ale liší se v závislosti na aktivaci. Například při aktivaci hlodavčích makrofágu thioglykolátem byla exprese výrazně vyšší, než při aktivaci LPS (Carlisle et al. 2002). Co se týče imunitních orgánů, nejvyšší exprese je v mandlích, poté ve slezině a nejnižší v thymu (Galiègue et al. 1995). Během neurologického zánětu roste u myši (s uměle navozenou encefalomyelitidou) množství mRNA CB₂ receptorů u mikroglíí v CNS a periferních makrofágů. Stejně tak roste množství některých prozánětlivých cytokinů, které právě v pozdějších fázích zánětu indukují expresi CB₂ (Maresz et al. 2005). Obecně pak mají CB₂ receptory imunosupresivní efekt, zánět potlačují, zmírňují bolest a tlumí expresi prozánětlivých cytokinů (Maresz et al. 2005; Vincent et al. 2016; Krustev, Muley, and McDougall 2017). Aktivace CB₂ potlačuje aktivitu cytotoxických T lymfocytů a aktivuje Treg lymfocyty (Robinson et al. 2015). Ve střevě se kanabinoidní systém podílí na rovnováze mezi střevní mikrobiotou a imunitním systémem a to tak, že anandamidová signalizace udržuje toleranci proti mikrobiálním antigenům (Acharya et al. 2017). Agonisté CB₂ (například beta-carophylen) mohou snižovat hladinu prozánětlivých cytokinů (například IL-23), působí tedy antineurotoxicky, čímž mohou potlačovat nebo zmírňovat zhoršování kognitivních funkcí spojených se stárnutím a rozvoj neurodegenerativních chorob typu Alzheimerovy choroby či sklerózy (Lindsey et al. 2019). Selektivní inhibitory FAAH, tedy enzymu degradujícího endokanabinoidy, zmírňovaly migraci leukocytů do kolenního kloubu vyvolanou působením *nervus saphenus* při neurozánětu (Krustev, Muley, and McDougall 2017). Typický ligand kanabinoidních receptorů Δ^9 -THC z konopí setého snižuje při zánětu hodnoty cytokinů IL-12 a IFN- γ a tím tlumí imunitní odpověď typu Th1 (Klein et al. 2000). U myši, které byly nakaženy

chřipkovým virem a tři dny po inokulaci jim bylo podáno Δ^9 -THC, došlo ke snížení exprese IFN- γ a IL-17, redukci počtu antigen prezentujících buněk a modulaci funkce dendritických buněk spojenou s redukcí aktivity T lymfocytů. U myší s vyřazenými geny pro CB₁ a CB₂ docházelo k imunopatologiím (Karmaus et al. 2013). Aktivace CB₂ receptorů také opoždí aktivaci mastocytů a s ním spojené příznaky bolesti při zánětu (Vincent et al. 2016). Z uvedených příkladů vyplývá, že během zánětu prozánětlivé cytokiny zvyšují expresi CB₂ receptorů, které svým působením hladinu prozánětlivých receptorů zase zpětně snižují. Jedná se tedy o jakýsi typ negativní zpětné vazby, která má za cíl tlumit a postupně ukončovat zánětlivou reakci. Málo je známo o roli CB₂ v ptačí imunitě.

1.3.4. Význam endokanabinoidního systému v gastrointestinálním traktu

V rámci gastrointestinálního systému mají kanabinoidní receptory významnou úlohu v regulaci některých procesů. Aktivace CB₁ receptorů (i umělými agonisty, například dronabinolem) nacházející se na neuronech enterického plexu inhibuje motilitu střevní svaloviny, redukuje tonus a relaxuje střevo (Esfandyari et al. 2007). Vlivem snížení motility hladké svaloviny trávicí soustavy dochází k inhibici sekrece kyselin a inhibici zvracení (Hasenoehrl et al. 2016). Kanabinoidní receptory také ovlivňují sekreci některých cytokinů a chemokinů střevním epitelem. Například agonisté CB₂ receptorů inhibují produkci IL-8, působí tedy protizánětlivým efektem. Expresí kanabinoidních receptorů i kanabinoidů se během intestinálního zánětu zvyšuje. Protizánětlivý efekt pak funguje jednak jako ochrana proti poškození epitelu, a jednak se inhibuje zvýšená motilita, ke které dochází během střevního zánětu (Di Marzo 2006). Kanabinoidní receptory jsou exprimované i na neuronech bloudivého nervu a působení endokanabinoidů odvozených od mastných kyselin z potravy moduluje aferentní signál a ovlivňuje tak i touto cestou regulaci motility, zvracení či sytost (Cristino, Becker, and Di Marzo 2014). CB₁ a CB₂ receptory exprimovány ve střevě na mikrovílech, buňkách myenterického plexu, hladkém svalstvu cév, či peyerových plátech se svojí aktivitou podílejí na udržování imunologické tolerance vůči antigenům přirozené střevní mikroflóry (Hasenoehrl et al. 2016). Ve střevě se vyskytuje regulační typ makrofágů CX3CR1^{hi}, který exprimuje větší počet CB₂ receptorů. Anandamid stimuluje přes CB₂ receptory tyto makrofágy, což vede k toleranci ve střevním prostředí (Acharya et al. 2017). Funkce imunitních buněk a imunotolerance může být ovlivňována také samotnými mikroorganismy, respektive jejich produkty. Bakterie mohou například produkovat jednoduché aminy včetně serotoninu, které se váží na serotoninové (5-HT) receptory na makrofázích. Mimo to také produkují látky na bázi kyseliny arachidonové podobné endokanabinoidům aktivující kanabinoidní receptory, jejichž exprese může také být

přímo aktivitou mikroflóry ovlivněna (Aguilera, Vergara, and Martínez 2013). Antibiotika, stres a modifikace střevní mikrobioty tak může měnit expresi CB₂ receptorů v rámci gastrointestinální soustavy (Aguilera, Vergara, and Martínez 2013).

2. Cíle diplomové práce

V této práci jsem se rozhodl zaměřit na neuroimunitní regulace u ptáků, především na fenomén osy střevo-mozek a ovlivňování procesů v nervové soustavě během zánětu, a také na význam kanabinoidních receptorů v regulacích nervových a především imunitních procesů. Tyto problematiky nejsou u ptáků tak dobře prozkoumány jako u savců. Neví se, jak u ptáků mohou imunitní reakce ovlivňovat nervové procesy a jak zánět ovlivňuje expresi imunitních a fyziologicky významných genů v nervové soustavě. Z tohoto důvodu jsem pro tuto diplomovou práci zvolil následující cíle:

- Porovnat expresi kanabinoidních receptorů a IL-1 β ve vybraných tkáních kognitivně pokročilých druhů ptáků: pěvců (zebríček) a různých druhů papoušků
- Popsat expresi kanabinoidních receptorů v mozku pěvců (zebríček) a různých druhů papoušků (pro porovnání mezidruhové a meziskupinové variability) s indukovaným intraperitoneálním sterilním zánětem, který má za cíl simulovat střevní zánět, způsobený například změnou střevní mikrobioty a který přes osu střevo-mozek ovlivňuje funkci CNS
- Popsat expresi prozánětlivého cytokinu IL-1 β v mozku zebríček a různých druhů papoušků s indukovaným intraperitoneálním zánětem a potvrdit tak vliv osy střevo-mozek u těchto druhů
- Zjistit, jestli závisí exprese kanabinoidních receptorů na expresi prozánětlivého cytokinu IL-1 β především v mozku, ale i v ostatních vybraných tkáních

3. Materiál a metody

3.1. Modelové organismy

Provedli jsme dva experimenty. Jeden s papoušky a později druhý se zebříčkami. V prvním experimentu jsme použili 32 jedinců šesti různých druhů papoušků: papoušek zpěvavý (*Psephotus haematonotus*), agapornis růžohrdlý (*Agapornis roseicollis*), neoféma ozdobná (*Neophema elegans*), andulka vlnkovaná (*Melopsittacus undulatus*), korela chocholatá (*Nymphicus hollandicus*) a papoušiček šedokřídý (*Forpus coelestis*). Všichni papoušci byli starší jednoho roku. Byli koupeni od drobných chovatelů a převezeni do chovů na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy ve Viničné 7 v Praze, kde byli drženi v klecích 100x50x50 cm za přirozeného osvětlení a přístupu ke krmivu (proso, zrní) a vodě po dobu jednoho týdne. Ve druhém experimentu bylo použito 24 samců zebřičky pestré (*Taeniopygia guttata*), běžného modelového druhu z řádu pěvců (Passeriformes). Ptáci byli koupeni od drobných chovatelů a převezeni do chovů PřFUK na Viničné 7. Zde byli v klecích po dobu tří dnů aklimováni za přirozeného osvětlení a s přístupem k potravě (proso) a vodě. Pro návrh primerů použitých u papouščíků druhů jsem použil také vzorky krve deseti andulek vlnkovaných odebraných v zoo Vyškov.

3.2. Průběh experimentů a odběr vzorků

V prvním experimentu bylo 32 jedinců papoušků šesti druhů rozděleno do dvou skupin (16 injikovaných LPS a 16 kontrol, vždy polovina jedinců jednoho druhu stimulována a polovina kontrolní, viz Tabulka č. 1.). Experiment jsme provedli ve dvou sériích (várkách): várka 2019 s dvanácti jedinci a várka 2020 s dvaceti jedinci. Každý pták byl zvážen. Pro tři zvířata (40-60 g) bylo připraveno 3 mg LPS (E.coli O55:B5, Sigma-Aldrich, katalogové číslo L2880) rozpuštěné v 600 µl DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, Sigma-Aldrich, kat. číslo D5652). Roztok LPS v dávkách 50 µl = 0,25 mg pro jedince s hmotností 10-40 g; 100 µl = 0,5 mg pro jedince s hmotností 40-70 g; 200 µl = 1,0 mg pro jedince s hmotností 70-100 g jsme ptákům injikovali intraperitoneálně do mediální části břicha. Následně jsme stejný roztok LPS v dávce 20 µl = 0,1 mg pro jedince s hmotností 10-40 g; 40 µl = 0,2 mg pro jedince s hmotností 40-70g; 60 µl = pro jedince s hmotností 70-100g injikovali subkutánně doprostřed levého a pravého křídla v oblasti patagia. Po 24 hodinách působení proběhlo usmrcení ptáků pomocí pozvolně se zvyšující koncentrace CO₂. Dobu 24 hodin jsme zvolili na základě imunitní reakce vedoucí ke vzniku otoků v kůži v místě injikace (Martin et al. 2006). Po usmrcení byly odebrány vzorky tkání – CSF, krev (uloženo do ethanolu na extrakci DNA), mozek, slezina, části GIT, plíce, prsní sval, ledvina, pankreas a uloženy do RNA lateru (Qiagen, kat. č. 76106).

Dále byly provedeny nekropsie kůže z levého a pravého křídla ve stimulovaném místě a vzorky taktéž uloženy do RNA lateru. Všechny vzorky byly skladovány v -80°C. K měření jsem dále použil vzorky mozku, střeva a kůže.

Tabulka č. 1.: Údaje o papoušcích použitých v prvním experimentu

Várka	Druh	Pohlaví	LPS/kontrola	Várka	Druh	Pohlaví	LPS/kontrola
2019	agapornis růžohrdlý	M	K	2020	korela chocholatá	M	LPS
2019	agapornis růžohrdlý	M	LPS	2020	korela chocholatá	M	K
2019	andulka vlnkovaná	M	K	2020	korela chocholatá	M	LPS
2019	andulka vlnkovaná	M	LPS	2020	korela chocholatá	F	K
2019	korela chocholatá	F	K	2020	neoféma ozdobná	M	LPS
2019	korela chocholatá	M	LPS	2020	neoféma ozdobná	F	K
2019	neoféma ozdobná	F	K	2020	neoféma ozdobná	F	LPS
2019	neoféma ozdobná	F	LPS	2020	neoféma ozdobná	M	K
2019	papoušek zpěvavý	M	K	2020	papoušek zpěvavý	F	LPS
2019	papoušek zpěvavý	M	LPS	2020	papoušek zpěvavý	F	LPS
2019	papoušíček šedokřídý	M	K	2020	papoušek zpěvavý	M	K
2019	papoušíček šedokřídý	M	LPS	2020	papoušek zpěvavý	M	K
2020	andulka vlnkovaná	M	LPS	2020	papoušíček šedokřídý	M	LPS
2020	andulka vlnkovaná	F	K	2020	papoušíček šedokřídý	F	K
2020	andulka vlnkovaná	F	LPS	2020	papoušíček šedokřídý	F	LPS
2020	andulka vlnkovaná	M	K	2020	papoušíček šedokřídý	M	K

V druhém experimentu jsme 24 zebříček (viz Tabulka č. 2.) rozdělili do dvou skupin (14 v první várce, 10 ve druhé várce druhý den). Všem ptákům jsme změřili běhák a hmotnost. V 700 µl DPBS jsme rozpustili 3,5 mg LPS. V každé várce jsme polovinu jedinců injikovali tímto roztokem LPS intraperitoneálně (100 µl; 0,1 mg) a subkutánně do levého křídla (20 µl; 0,1 mg) v oblasti patagia. Po aplikaci byli ptáci umístěni zpět do klece na dobu 24 hodin. Po této době byla ptákům změřena tloušťka místa na křídle, kam bylo LPS injikováno. Následně byla provedena eutanázie dekapitací. Odebrali jsme vzorky krve (uloženy do ethanolu na extrakci DNA), vzorky mozkové tkáně, vzorky všech částí trávicí soustavy, sleziny, plic, svalů a nekropsie kůže z levého (stimulovaného) křídla stimulovaných ptáků v oblasti patagia a z pravého (nestimulovaného) křídla ve stejné oblasti u všech jedinců. Vzorky byly vloženy do

mikrozkumavek s RNA laterem (Qiagen, kat. č. 76106) a umístěny do -80 °C. K další práci jsem použil vzorky, mozku, sleziny a kůže.

Tabulka č. 2.: Údaje o zebříčkách použitých v druhém experimentu

Číslo jedince	Druh	Pohlaví	LPS/kontrola	Číslo jedince	Druh	Pohlaví	LPS/kontrola
1	<i>Taeniopygia guttata</i>	M	LPS	13	<i>Taeniopygia guttata</i>	M	LPS
2	<i>Taeniopygia guttata</i>	M	K	14	<i>Taeniopygia guttata</i>	M	K
3	<i>Taeniopygia guttata</i>	M	LPS	15	<i>Taeniopygia guttata</i>	M	LPS
4	<i>Taeniopygia guttata</i>	M	K	16	<i>Taeniopygia guttata</i>	M	K
5	<i>Taeniopygia guttata</i>	M	LPS	17	<i>Taeniopygia guttata</i>	M	LPS
6	<i>Taeniopygia guttata</i>	M	K	18	<i>Taeniopygia guttata</i>	M	K
7	<i>Taeniopygia guttata</i>	M	LPS	19	<i>Taeniopygia guttata</i>	M	LPS
8	<i>Taeniopygia guttata</i>	M	K	20	<i>Taeniopygia guttata</i>	M	K
9	<i>Taeniopygia guttata</i>	M	LPS	21	<i>Taeniopygia guttata</i>	M	LPS
10	<i>Taeniopygia guttata</i>	M	K	22	<i>Taeniopygia guttata</i>	M	K
11	<i>Taeniopygia guttata</i>	M	LPS	23	<i>Taeniopygia guttata</i>	M	LPS
12	<i>Taeniopygia guttata</i>	M	K	24	<i>Taeniopygia guttata</i>	M	K

3.3. Návrh primerů pro sekvenaci CNR genů

Ze vzorků krve papoušků a zebříček uložených v ethanolu jsem extrahoval genomovou DNA pomocí komerčního kitu DNeasy® Blood & Tissue Kit (QIAGEN, kat. číslo 69581). Při extrakci DNA jsem postupoval podle návodu od výrobce. Množství DNA jsem změřil na zařízení NanoDrop 1000 Spectrophotometr (Termo Fisher Scientific). Extrahovanou DNA jsem využil pro sekvenaci genů kanabinoidních receptorů u papoušků a zebříček, zjištění variability v daném genu a návrhu RT-PCR primerů. Použil jsem vzorky vybraných dvanácti jedinců papoušků a vybraných dvanácti jedinců zebříček. Pro sekvenaci daných genů bylo potřeba navrhnout pár primerů (F + R) v programu Geneious podle referenčních sekvencí různých druhů pěvců a papoušků z NCBI databáze (Gene ID pro *CNR1*: 103800500; 103621440; 103763212; 107202377; 102104259; 751607; 101871028; 104401525 a pro *CNR2*: 103804346; 103616829; 103754705; 107214204; 102112261; 100230496). Sekvence primerů jsou uvedeny v tabulce č. 3. Pozice primerů jsou na obrázcích č. 3.1.; 3.2. a 4.

Tabulka č. 3.: Sekvence a názvy PCR primerů použitých pro amplifikaci a sekvenaci vybraných úseků *CNR1* a *CNR2*.

Druh	Cílový gen	Název	Sekvence	Typ (5'→3')	Teplota tání (°C)	Délka produktu (bp)
Psittaciformes, Passeriformes	<i>CNR1</i>	psipaCNR1-F1_-11	AGACTGGGGTTATGAAGTCA	F (přední)	52,8	1408
Psittaciformes, Passeriformes	<i>CNR1</i>	psipaCNR1-R1_1397	GTGGAGACAGACATGGTAAC	R (zadní)	52,6	
<i>Taeniopygia guttata</i>	<i>CNR2</i>	TaGuCNR2-F1_24	AAACGCCTCCAAGTGCAG	F (přední)	56	1006
<i>Taeniopygia guttata</i>	<i>CNR2</i>	TaGuCNR2-R1_1029	GCAGATGGTCTCTATCACGG	R (zadní)	57,2	



Obrázek č. 3.1.: Gen *CNR1* zebříček s vyznačeným předním a zadním primerem. Sekvence genu tmavě zeleně, mRNA červeně, kodující oblast žlutě, primery světle zeleně.

3.4. Sekvenace *CNR* genů a návrh RT-qPCR primerů

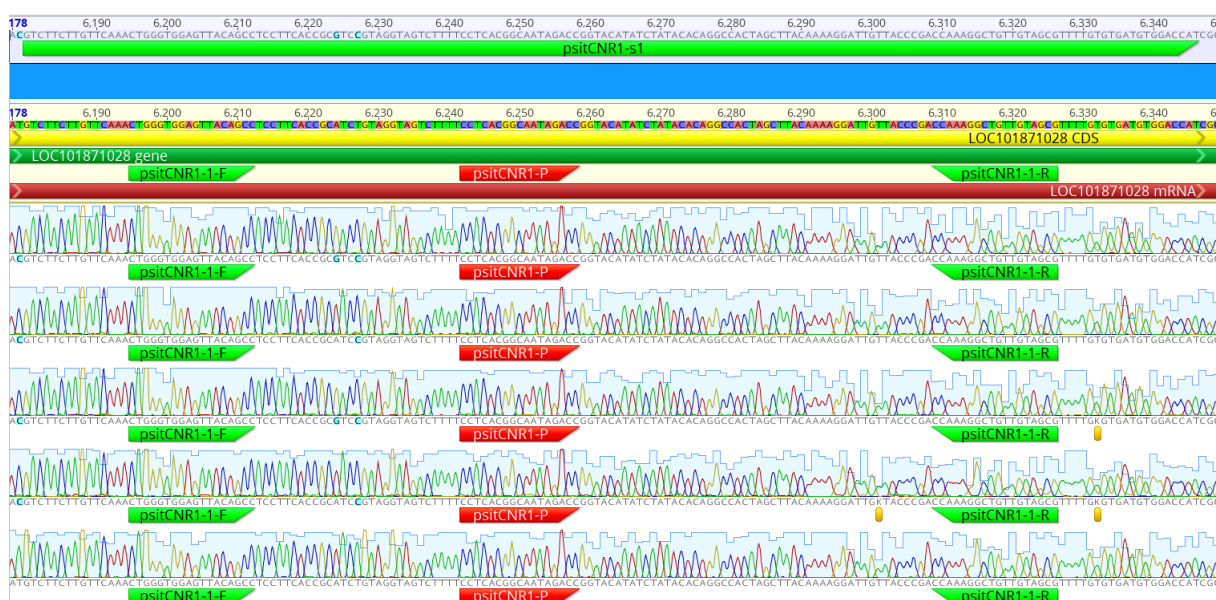
Po návržení vhodných primerů jsem provedl PCR za účelem amplifikace sekvence daného genu pomocí komerčního kitu QIAGEN® Multiplex PCR Plus kit. Pro každý gen (*CNR1* a *CNR2*) jsem využil vzorky DNA vybraných dvanácti jedinců zebřiček, dvanácti jedinců papoušků a deseti jedinců andulek vlnkovaných ze ZOO Vyškov. Reakční směs pro jeden vzorek obsahovala 6,04 μ l ddH₂O; 8,00 μ l reakčního pufru a 0,96 μ l 5 μ M směsi F + R primeru, kterou jsem připravil z 5 μ l F (předního) primeru; 5 μ l R (zadního) primeru a 90 μ l ddH₂O. Následně jsem do každé PCR reakce přidal 15 μ l z reakční směsi a 1 μ l templátové genomové DNA daného jedince. PCR protokol je uveden v tabulce č. 4. Úspěšnost PCR jsem ověřil horizontální elektroforézou 5 μ l PCR produktu na 1,5% agarózovém gelu (100 V, 30 min). Poté jsem výsledný produkt přečistil ExoSAP-IT PCR Clean-up Kitem (BioLabs®Inc). Pro jednu reakci jsem namíchal směs obsahující 1,1 μ l Exonukleázy I a 2,2 μ l Shrimp Alkaline Phosphatase. Ke každému PCR produktu jsem přidal 3,3 μ l směsi. Přečišťování probíhalo v termocycleru: 37°C po dobu 15 minut a 80°C po dobu 15 minut. Pročištěné PCR produkty jsem odeslal do sekvenační laboratoře v BIOCEVu (Biotechnologické a biomedicínské centrum ve Vestci). 7 μ l na sekvenaci F primerem (5 μ M) a 7 μ l na sekvenaci R primerem (5 μ M) daného genu. Sekvenace probíhala Sangerovou metodou na sekvenátoru 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Podle výsledných sekvencí analyzovaných v programu Geneious verze 11.0.5. jsem navrhl RT-qPCR primery, sondy (proby) a standardy v konzervovaných místech genu. RT-qPCR primery a proby jsou uvedeny v tabulce č. 5. Pozice primerů viz Obrázek č. 5.; 6.1. a 6.2. Standardy jsou uvedeny v tabulce 10.

Tabulka č. 4.: PCR protokol použitý k amplifikaci *CNR* genů

Teplota	Čas	Počet cyklů
95°C	5 min	1
95°C	30 s	35 x
62°C	90 s	
72°C	30 s	
68°C	10 min	1
4 °C	∞	1

Tabulka č. 5.: Sekvence a názvy RT-qPCR primerů a prob

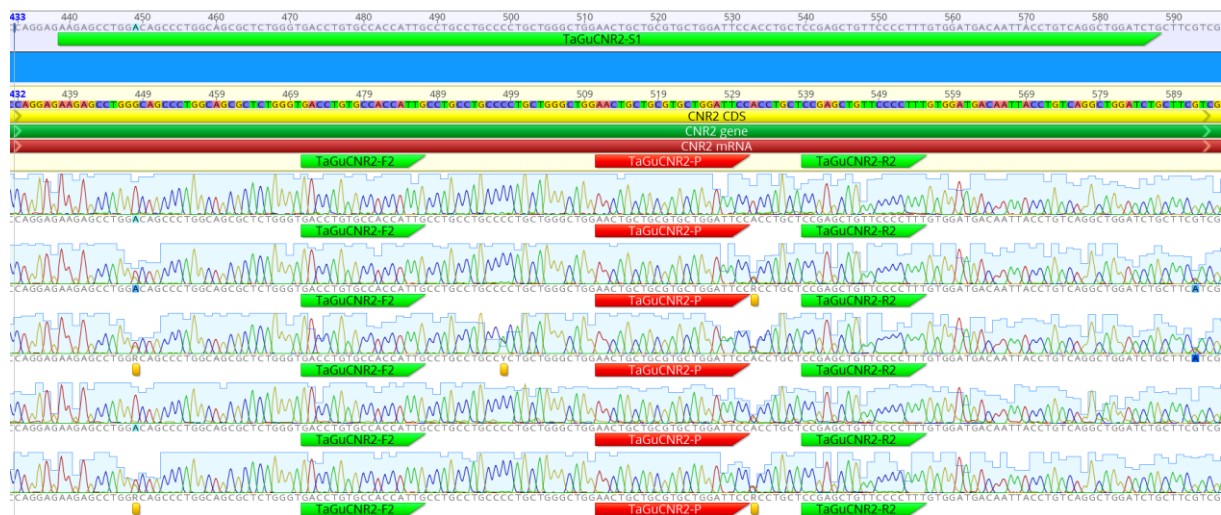
Druh	Cílový gen	Název	Sekvence	Typ (5'→3')
Psittaciformes	<i>CNR1</i>	psitCNR1-1-F	CTGGGTGGAGTTACAGCC	F (přední)
Psittaciformes	<i>CNR1</i>	psitCNR1-1-R	CCAAAGGCTGTTGTAGCG	R (zadní)
Psittaciformes	<i>CNR1</i>	psitCNR1-P	CCTCACGGCAATAGACC	Probe
<i>Taeniopygia guttata</i>	<i>CNR1</i>	taguCNR1-1-R	GCAGGTCAACATCACAGAG	R (zadní)
<i>Taeniopygia guttata</i>	<i>CNR1</i>	taguCNR1-F2	GGGGTGATCCTTTCCAAG	F (přední)
<i>Taeniopygia guttata</i>	<i>CNR1</i>	TaGuCNR1-P	ATTCCCTGTTGAGCATTATCCCTCAG	Probe
<i>Taeniopygia guttata</i>	<i>CNR2</i>	TaGuCNR2-F2	GACCTGTGCCACCATTG	F (přední)
<i>Taeniopygia guttata</i>	<i>CNR2</i>	TaGuCNR2-R2	AAAGGGGAACAGCTCGG	R (zadní)
<i>Taeniopygia guttata</i>	<i>CNR2</i>	TaGuCNR2-P	AACTGCTGCGTGCTGGATTCC	Probe



Obrázek č. 5.: Srovnání sekvencí genu *CNR1* vybraných jedinců papoušků s referenční sekvencí tohoto genu u *Melopsittacus undulatus* (gene ID: 101871028). V sekvencích jsou znázorněny přední a zadní primer (zeleně) a sonda (červeně). Nahoře vyznačení standardu.



Obrázek č. 6.1.: Srovnání sekvencí genu *CNR1* vybraných jedinců zebřiček s referenční sekvencí tohoto genu (gene ID: 751607). V sekvencích jsou znázorněny přední a zadní primer (zeleně) a sonda (červeně). Nahoře vyznačení standardu.



Obrázek č. 6.2.: Srovnání sekvencí genu *CNR2* vybraných jedinců zebřiček s referenční sekvencí tohoto genu (gene ID: 100230496). V sekvencích jsou znázorněny přední a zadní primer (zeleně) a sonda (červeně). Nahoře vyznačení standardu.

3.5. Extrakce DNA z gelu pro sekvenaci *CNR2*

Při použití primerů TaGuCNR2-F1_24 a TaGuCNR2-R1_1029 pro sekvenaci *CNR2* genu u papoušků se nespecifické elektroforetické signály objevily pouze u některých jedinců (konkrétně u andulky vlnkované a neofémy ozdobné). Vzhledem k množství elektroforetických signálů bylo potřeba extrahovat DNA přímo z gelu, dva proužky v přibližné délce 1000 bp (viz Obrázek č. 7.). Využil jsem komerční kit QIAquick® Gel Extraction and Kit & QIAquick® PCR & Gel Cleanup Kit (QIAGEN, kat. číslo 28704, 28706, 28506 a 28115). Při extrakci a pročišťování DNA z gelu jsem postupoval podle návodu od výrobce. Množství DNA jsem změřil na zařízení NanoDrop 1000 Spectrophotometr (Termofisher). Extrahovanou DNA jsem odeslal na sekvenaci do sekvenační laboratoře v BIOCEVu. 7 µl na sekvenaci 5 µM F primerem a 7 µl na sekvenaci 5 µM R primerem daného genu.

3.6. Měření exprese kanabinoidních receptorů pomocí RT-qPCR

Provedl jsem RT-qPCR s cílem změřit expresi *CNR1* v mozkové tkáni, kůži a ve střevě u 32 jedinců papoušků, (šest druhů, vždy polovina od každého druhu stimulována LPS a polovina kontrolní, viz Tabulka č. 1. U 24 jedinců zebřiček (12 stimulovaných LPS a 12 kontrolních, Tabulka č. 2.) jsem měřil expresi *CNR1* a *CNR2* v mozkové tkáni, slezině a kůži. Z daných tkání jsem vyextrahoval RNA pomocí komerčního kitu High Pure RNA Tissue Kit (12033674001, Roche). Izolovanou RNA jsem zředil na dva sety o koncentracích 1:5 (120 µl H₂O a 30 µl RNA vzorku) a 1:500 (499 H₂O a 1 µl RNA vzorku). Expresi jsem měřil na light cycleru LC®480 Instrument (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland) s použitím kitu Luna® Universal Probe One-Step RT-PCR Kit (E3006, BioLabs®Inc). LC®480 využívá fluorescenční značení pro kvantitativní detekci průběhu amplifikace DNA v reálném čase (real time-quantitative PCR; RT-qPCR). RT-qPCR je vysoce senzitivní a umožňuje kvantifikaci malých změn v genové expresi (Pfaffl 2001). Změřený fluorescenční signál během cyklování koreluje s množstvím PCR produktu, z čehož se dá vypočítat množství dané RNA ve vzorku. K tomu je zapotřebí sondy (probe) s fluorescenčním značením a zhášečem v těsné blízkosti, takže je zabráněno fluorescenci, přičemž při amplifikaci dochází k hydrolýze sondy a vzniklá část s fluorescenčním značením tak emituje světelný signál. Relativní kvantifikace je založená na porovnání relativní exprese cílového genu vůči relativní expresi referenčního genu. Proto je třeba normalizovat množství cílového genu referenčním genem (tzv. housekeeping gen), jehož exprese je stabilní za různých fyziologických stavů (Pfaffl 2001). V tomto pokusu byl jako referenční gen použit gen pro 28S rRNA. K analýze je nutné spočítat tzv. efektivitu specifických primerů na standardu, krátkého syntetického oligonukleotidu daného genu (cca

150 bp). Efektivita vyjadřuje reálnou amplifikaci a je rovna přibližně číslu 2, tedy počtu vláken dané DNA po amplifikaci během jednoho cyklu. Dále měří takzvané crossing pointy (Cp) – body, kdy se amplifikační křivka vzorku začíná strmě zvedat, což odpovídá maximu druhé derivace amplifikační křivky. Čím je tedy vyšší hodnota Cp, tím později byl gen zaznamenán, tedy vzorek obsahoval méně mRNA daného genu. Reakční směs jsem připravil dle návodu od výrobce, množství jednotlivých složek je uvedeno v tabulce č. 6. Z reakční směsi jsem napipetoval 5 µl pro každý vzorek do jamky na destičce LightCycler® 480 Multiwell Plate 384, white (Roche). K tomu jsem přidal 1 µl vzorku RNA. V případě cílového genu v koncentraci 1:5, v případě referenčního genu (28S) v koncentraci 1:500. Každý vzorek jsem připravil v triplicátu. K výpočtu efektivy jsem připravil koncentrační řadu standardu od 10^8 po 10^2 kopií na reakci, která zároveň sloužila jako pozitivní kontrola. Koncentrační řadu standardu jsem připravil též v triplicátech, reakční podmínky byly stejné jako u vzorků. Na základě hodnot Cp koncentrační řady je programem sestrojena kalibrační křivka důležitá pro výpočet efektivy. Amplifikace probíhala podle protokolu v tabulce č. 7.

Tabulka č. 6.: Reakční směs pro RT-PCR

Hodnoty jsou uvedené pro jednu reakci. Množství dané složky bylo vynásobeno počtem vzorků

Složka	6 µL v jedné reakci	Výsledná koncentrace
Luna Universal Probe One-Step Reaction Mix (2X)	3	1x
Luna WarmStart RT Enzyme Mix (20X)	0.3	1x
F a R primery (5µM)	0.72	0,6 µM
Probe (10µM)	0.12	0,2 µM
Nuclease free water	0.86	-
Templatová RNA	1	-
Výsledný objem	6	-

Tabulka číslo 7.: RT-qPCR protokol

Program	Počet cyklů	Analyzační mód	Teplota °C	Měření fluorescence	Doba h:m:ss	Nabíhání cyklu
Reverzní transkripce	1	-	55	ne	0:10:00	4.4
Iniciační denaturace	1	-	95	ne	0:01:00	4.4
Extenze	45	Kvantifikace	95	ne	0:00:10	1.5
			60	ano	0:00:30	2.2
Chlazení	1	-	40	ne	0:00:10	2.2

3.7. Výpočet relativní kvantifikace

K výpočtu relativní kvantifikace cílového genu jsem potřeboval změřené hodnoty efektivity a hodnoty Cp. Efektivita je vypočítána ze sklonu standardní křivky podle rovnice: $E = 10^{(-\frac{1}{\text{sklon}})}$ automaticky v programu LightCycler480 SW 1.5.1. Hodnoty Cp jsou změřeny light cyclerem v okamžiku první detekce amplifikovaného produktu. Ke zjištění relativní exprese cílového genu stimulovaných jedinců oproti kontrolním v porovnání s referenčním genem jsem vypočítal relativní expresní poměr $R = \frac{(E_{\text{cílův gen}})^{\Delta C_{\text{p cílový gen (kontrola-LPS)}}}}{(E_{\text{referenční gen}})^{\Delta C_{\text{p referenční gen (kontrola-LPS)}}}}$. Kde E je efektivita, Cp crossing pointy daných genů, $\Delta C_{\text{p cílový gen}}$ je rozdíl hodnot Cp změřených u kontrolních jedinců a stimulovaných jedinců pro cílový gen, $\Delta C_{\text{p referenční gen}}$ je rozdíl hodnot Cp změřených u kontrolních jedinců a stimulovaných jedinců pro referenční gen. Expresní poměr R udává, kolikrát se zvýšila exprese daného genu u stimulovaných jedinců oproti kontrolním (Pfaffl 2001). Pro statistické testování rozdílu v expresi vybraných genů mezi kontrolními a stimulovanými jedinci je vypočteno relativní množství RNA ve vzorku jako $Q = E^{\Delta C_{\text{p}}}$, kde E je efektivita a ΔC_{p} je rozdíl mezi nejmenší změřenou hodnotou Cp a Cp daného vzorku. Pro standardizaci množství RNA cílového genu je použita hladina exprese referenčního genu, tedy v našem případě genu pro 28S rRNA takto: $Q_{\text{st}} = \frac{Q_{\text{cílůvého genu}}}{Q_{\text{referenčního genu}}}$ (Vinkler et al. 2018). Hodnota efektivity u papoušků pro gen *CNR1* vyšla 1,940 a pro gen *28S* 1,980. U zebříček 1,967 pro *CNR1*, 1,985 pro *CNR2* a 2,024 pro *28S*.

3.8. Měření exprese *IL-1β*

K měření exprese *IL-1β* jsem použil vzorky mozku, kůže a střeva 32 jedinců papoušků (šest druhů, vždy polovina od každého druhu stimulována LPS a polovina kontrolní, viz Tabulka č. 1. a vzorky mozku, kůže a sleziny z 24 jedinců zebříček (12 kontrolních a 12 stimulovaných, viz Tabulka č. 2.). Pro návrh RT-qPCR primerů jsem potřeboval osekvenovat gen u vybraných jedinců zebříček. K tomu jsem musel navrhnout ještě pár primerů podle sekvence genu u zebříček stažené z NCBI databáze (Gene ID: 100227014). Sekvence primerů jsou uvedeny v tabulce č. 8. Po navržení vhodných primerů jsem provedl PCR za účelem amplifikace sekvence daného genu pomocí komerčního kitu QIAGEN® Multiplex PCR Plus kit. K tomu jsem využil genomovou DNA šesti jedinců zebříček. PCR, elektroforézu, přečištění i sekvenaci *IL-1β* jsem provedl stejnými kity i postupy jako u *CNR* genů. Podle výsledných sekvencí jsem navrhl RT-qPCR primery, sondy a standardy v konzervovaných místech genu. RT-qPCR primery a proby jsou uvedené v tabulce č. 9. Pro měření exprese *IL-1β* u papoušků jsem použil

již navržené RT-PCR primery uvedené taktéž v tabulce č. 9. Standardy jsou uvedeny v tabulce č. 10. Reakční směs pro RT-PCR jsem připravil stejně jako u *CNR* genů podle tabulky č. 6. Cyklizace probíhala stejně jako u *CNR* genů podle protokolu v tabulce č. 7. Efektivita primerů pro *IL-1β* je u zebříček rovna 1,969 a u papoušků 1,950.

Tabulka č. 8.: Sekvence PCR primerů pro sekvenaci *IL-1β*

Druh	Cílový gen	Název	Sekvence	Typ (5'→3')	Teplota tání (°C)	Délka produktu (bp)
<i>Taeniopygia guttata</i>	<i>IL-1β</i>	TaGu_IL1B_F1	GGACACACTGGAGAGCA	F	54,2	904
<i>Taeniopygia guttata</i>	<i>IL-1β</i>	TaGu_IL1B_R1	GCTGGTAGCCCTTGATAC	R	52,5	

Tabulka č. 9.: Sekvence RT-PCR primerů pro měření exprese *IL-1β*

Druh	Cílový gen	Název	Sekvence	Typ (5'→3')
<i>Taeniopygia guttata</i>	<i>IL-1β</i>	HaMeIL1B-F2	TGCTGGACAGAAAGTGAAGCT	F
<i>Taeniopygia guttata</i>	<i>IL-1β</i>	TaGu_IL1B_R1	GCTGGTAGCCCTTGATAC	R
<i>Taeniopygia guttata</i>	<i>IL-1β</i>	HaMeIL1B-P1	CAACATTGCTCTGTACCGTCCCCG	Probe
Psittaciformes	<i>IL-1β</i>	psiIL1B-F1	TGCTGGAGTCACCCACTC	F
Psittaciformes	<i>IL-1β</i>	psiIL1B-R1	GTTGGTAGCCCTTGATGCC	R
Psittaciformes	<i>IL-1β</i>	psiIL1B-P1	CCTCTGCTGGGCGGAAAGTGA	Probe

Tabulka č. 10.: Sekvence standardů pro měření efektivity primerů

Název standardu	Sekvence	Cílový gen	Druh
TaGu-IL1B-S1	CCTACACCTACAGGGACCTTCTGCTGGACAGAAAGTG AAGCTCAACATTGCTCTGTACCGTCCCCGCCATCGC AGGGCAGTCCAGGGTCTGGAAGGATGCCGGTGGCGTT GGGTATCAAGGGCTACCAGCTCTACATGTCATGTGTG AT	<i>IL-1β</i>	<i>Taeniopygia guttata</i>
TaGuCNR2-S1	AAGAGCCTGGACAGCCCTGGCAGCGCTCTGGGTGACC TGTGCCACCATTGCCTGCCTGCCCTGCTGGGCTGGA ACTGCTGCGTGCTGGATTCCACCTGCTCCGAGCTGTTC CCCTTTGTGGATGACAATTACCTGTCAGGCTGGATCT G	<i>CNR2</i>	<i>Taeniopygia guttata</i>
TaGuCNR1-S1	CTACCCCCAGAAGTTCCCTCTTTCTTCCTTCAGGGGTG ATCCTTTCCAAGAAAAAATGACTGGAGGAGATGATTTC CCTGTTGAGCATTATCCCTCAGAGCAGGTCAACATC ACAGAGTTTTACAACAAGTCCCTGTCCACTTTTAAGG A	<i>CNR1</i>	<i>Taeniopygia guttata</i>
psiIL1B-S1	TATTGACCAGAAGTGCTTCGTGCTGGAGTCACCCACT CAGCTGGTGGCCCTGCACCTGCAGGGACCCTCTGCTG GGCGGAAAGTGAAGCTCAACATCGCTCTGTACCGTCC TCAGTCATCACAGGGTGGCCAGGGACTGGGCGGGTG CCAGTGGCATTGGGCATCAAGGGCTACCAACTCTACA TGTCATGTGTGATG	<i>IL-1β</i>	Psittaciformes
psitCNR-s1	GTCTTCTTGTTCAAACCTGGGTGGAGTTACAGCCTCCTT CACC CGTCCGTAGGTAGTCTTTTCCTCACGGCAATA GACCGGTACATATCTATACACAGGCCACTAGCTTACA AAAGGATTGTTACCCGACCAAGGCTGTTGTAGCGTT TTGTGTGATGTGGACCAT	<i>CNR1</i>	Psittaciformes

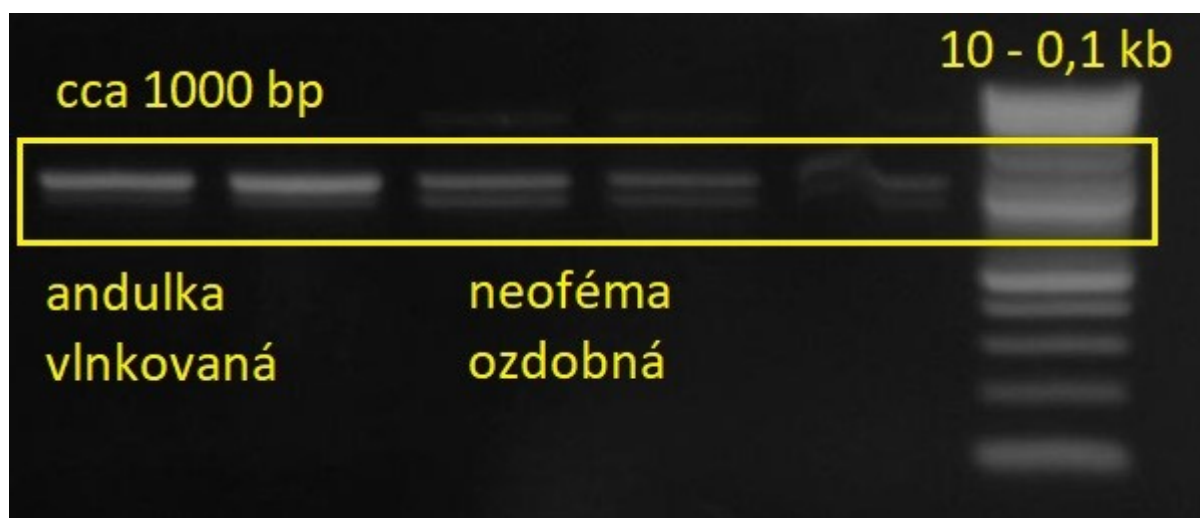
3.9. Statistické analýzy

Data jsem analyzoval v programu R verze 3.6.2. Shapiro-Wilkovým testem jsem nejprve ověřil nenormální rozdělení hodnot Qst. Hodnoty Qst jsem normalizoval použitím dekadického logaritmu. Testování závislosti genové exprese na vybraných znacích u 32 papoušků z prvního experimentu jsem provedl porovnáváním lineárních modelů s nulovým modelem pomocí balíčku lme4. V rámci plného základního modelu jsem použil následující faktory: stimulace, pohlaví, várka, druh. Tento plný model byl následně zjednodušován sestupnou eliminací členů až na minimální adekvátní model (MAM; tj. model se všemi členy statisticky signifikantními, tj. $P < 0,05$ anebo marginálně nesignifikantními $0,10 < P \leq 0,05$) na základě hodnot Akaikeho kritéria (AIC). Kandidátní modely byly porovnávány na základě změn deviance s příslušnou změnou stupňů volnosti s využitím analýzy rozptylu (ANOVA) a F statistiky. Závislost genové exprese u zebřiček jsem testoval stejnou metodu, avšak zde jsem pro plný model použil pouze faktory tkáň a stimulace. Provedl jsem Wilcoxonův test a sestrojil krabicové diagramy, které vizualizují rozdíl v expresi *IL-1 β* , *CNR1* a případně *CNR2* v různých tkání v závislosti na stimulaci. Pro výpočet závislosti exprese *CNR* genů na expresi *IL-1 β* jsem použil korelační test R hodnot daných genů.

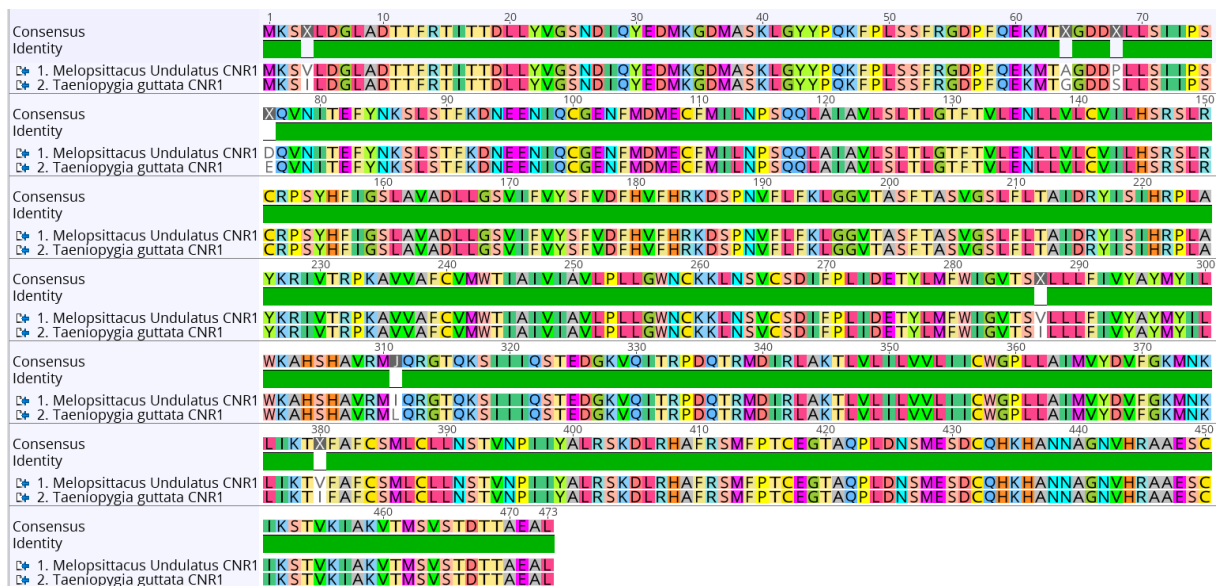
4. Výsledky

4.1. *CNR* geny v genomu zebřiček a papoušků

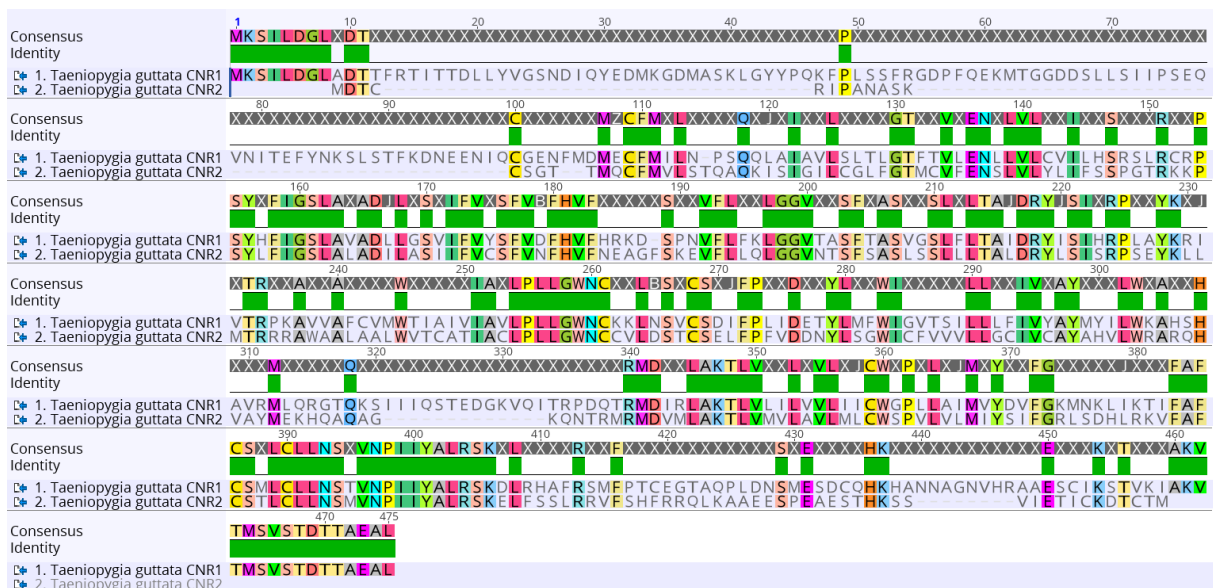
Mezidruhové srovnání kódujících úseků genů *CNR1* a *CNR2* stažených z genové databáze NCBI u zebřiček a vybraných druhů papoušků ukázalo následující: Gen *CNR1* leží u zebřiček na chromozomu 3 a má jeden exon. Délka kodující oblasti je dlouhá 1422 bp. U andulek má kodující oblast tohoto genu velikost 1423 bp a obsahuje také jeden exon. Délka proteinu je 473 aminokyselin u obou druhů, přičemž se sekvence liší jen v několika málo aminokyselinách (viz Obrázek 8.1.). Navrhnuté PCR primery společné pro papoušky a pěvce amplifikují úsek dlouhý 1407 bp (viz Obrázek č. 3.1. a Obrázek č. 3.2.). Gen *CNR2* u zebřiček leží na 23 chromozomu a má taktéž jeden exon. Délka kodující sekvence je 1050 bp. PCR primery navrhnuté pro zebřičky amplifikují úsek odpovídající 1006 bp (viz Obrázek č. 4.). Délka proteinu je 490 aminokyselin, sekvence se velmi liší od proteinu *CNR1* (viz Obrázek 8.2.). Pro *CNR2* gen jsem v databázi nenašel odpovídající sekvence tohoto genu u žádného z druhů papoušků. Při sekvenaci genomové DNA jsem prokázal nepřítomnost genu pro kanabinoidní receptor druhého typu v genomové DNA papoušků. Sekvence získané na základě sekvenování produktů amplifikovaných pomocí primerů TaGuCNR2-F1_24 a TaGuCNR2-R1_1029 (viz kapitola 3.5.) se významným způsobem neshodovaly s žádnou sekvencí uloženou v databázi NCBI GenBank. Tuto skutečnost jsem považoval za podporu absence genu *CNR2* u papoušků. Proto jsem u papoušků pracoval pouze s genem *CNR1*. U zebřiček se pracovalo s oběma typy receptorů. Sekvence těchto genů u vybraných jedinců jsem opět srovnal na základě referenčních sekvencí genů daných druhů (viz obrázky 5.; 6.1. a 6.2.) a v konzervovaných úsecích jsem navrhl primery pro RT-PCR (kapitola 3.4.).



Obrázek č. 7.: Elektroforetické signály *CNR2* u papoušků. Na obrázku jsou zobrazeny elektroforetické signály pro gen *CNR2* u druhů andulky vlnkové a neofémy ozdobné. Napravo žebřík s definovanou velikostí. Délka odpovídá cca 1000 bp.



Obrázek 8.1.: Srovnání aminokyselinových sekvencí proteinů CNR1 andulky vlnkové (Melopsittacus undulatus CNR1) a zebřičky pestré (Taeniopygia guttata CNR1).



Obrázek 8.2.: Srovnání aminokyselinových sekvencí proteinu CNR1 zebřičky pestré (Taeniopygia guttata CNR1) a proteinu CNR2 zebřičky pestré (Taeniopygia guttata CNR2).

4.2. Expresse vybraných genů po stimulaci LPS u papoušků

Zjistil jsem, že exprese *IL-1 β* v mozku papoušků je závislá na stimulaci LPS, na věku a na pohlaví (MAM: Df = 3/28; F = 6,451; P = 0,002; Tabulka č. 11.). Expresse *IL-1 β* ve střevě je závislá na LPS stimulaci, druhu a věku (MAM: Df = 7/24; F = 13,255; P << 0,001; Tabulka č. 12.). V kůži se exprese *IL-1 β* mění pouze v závislosti na LPS stimulaci (MAM: Df = 1/31; F = 9,108; P = 0,005; Tabulka č. 13.). U stimulovaných jedinců můžeme ve všech tkáních vidět zvýšenou expresi *IL-1 β* (Obrázek č. 9.). Expresse kanabinoidních receptorů (*CNR1*) u papoušků v mozku (MAM: Df = 6/25; F = 3,412; P = 0,013; Tabulka č. 14.) a střevě (MAM: Df = 6/25; F = 2,443; P = 0,054; Tabulka č. 15.) není vůbec závislá na LPS stimulaci, nejvýznamnějším faktorem je zde pohlaví daného jedince. Pro expresi *CNR1* v kůži vyšlo, že je závislá na LPS stimulaci a druhu marginálně nesignifikantně (MAM: Df = 6/25; F = 1,990; P = 0,105; Tabulka č. 16.). Pro *CNR1* nepozorujeme změnu exprese v závislosti na stimulaci v mozku a ve střevě (Obrázek č. 10.). V kůži nalézáme negativní vztah, tedy že exprese *CNR1* se při stimulaci LPS mírně snižuje (viz Obrázek č. 10.). Expresse *CNR1* nekoreluje s expresí *IL-1 β* v mozku (P = 0,690; r = 0,108; Obrázek č. 11.) a ve střevě (P = 0,518; r = 0,175; Obrázek č. 12.). V kůži koreluje exprese *CNR1* s *IL-1 β* marginálně nesignifikantně (P = 0,09; r = 0,431; Obrázek č. 13.).

Tabulka č. 11.: Mezidruhové srovnání relativní exprese (Qst) *IL-1 β* v mozku papoušků. MAM: Df = 3/28; F = 6,451; P = 0,002. Df = stupně volnosti. Várka = skupina ptáků, která byla stimulována v jednom období. Plný model viz Tabulka č. 20. v přílohách.

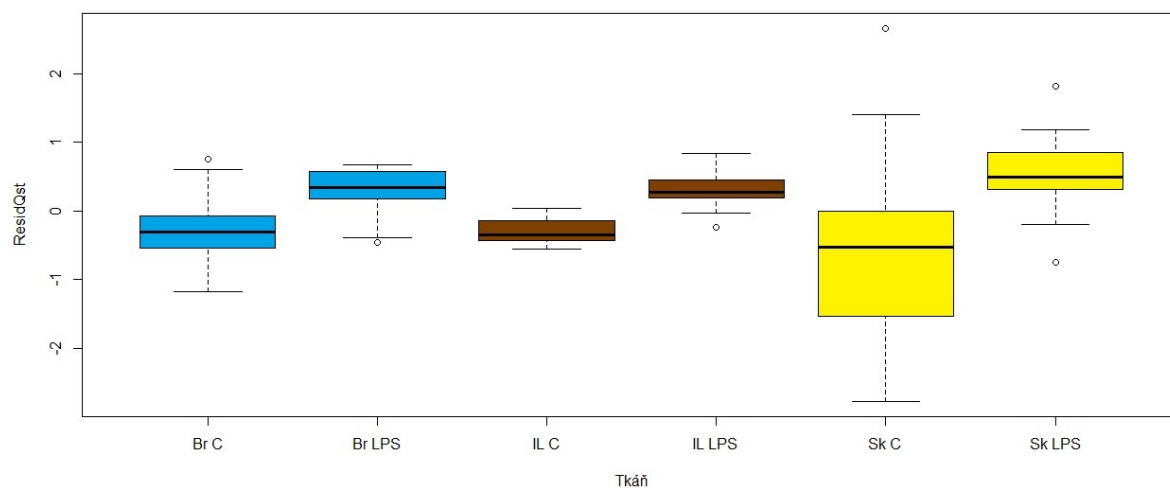
Znak	Df	F hodnota	P hodnota
IL-1β ~ Stimulace + Pohlaví + Várka	3/28	6,451	0,002
Stimulace	1/29	11,262	0,002
Várka	1/29	5,078	0,032
Pohlaví	1/29	4,628	0,040

Tabulka č. 12.: Mezidruhové srovnání relativní exprese (Qst) *IL-1 β* ve střevě papoušků. MAM: Df = 7/24; F = 13,255; P << 0,001. Df = stupně volnosti. Várka = skupina ptáků, která byla stimulována v jednom období. Plný model viz tabulka 21. v přílohách.

Znak	Df	F hodnota	P hodnota
IL-1β ~ Stimulace + Druh + Várka	7/24	13,255	<<0,001
Stimulace	1/25	49,131	<<0,001
Druh	5/25	5,585	0,002
Várka	1/25	13,863	0,001

Tabulka č. 13.: Mezidruhové srovnání relativní exprese (Qst) *IL-1 β* vkůži papoušků. MAM: Df = 1/30; F = 9,108; P = 0,005. Df = stupně volnosti. Plný model, viz tabulka 22. v přílohách

Znak	Df	F hodnota	P hodnota
IL-1β ~ Stimulace	1/30	9,108	0,005
Stimulace	1/30	8,821	0,006



Obrázek č. 9.: Závislost residuálních hodnot Qst vyjadřující míru exprese *IL-1 β* na stimulaci a typu tkáně. Br C = kontrolní mozek; Br LPS = stimulovaný mozek; IL C = kontrolní střevo; IL LPS = stimulované střevo; Sk C = kontrolní kůže; Sk LPS = stimulovaná kůže

Tabulka č. 14.: Mezidruhové srovnání relativní exprese (Qst) *CNR1* v mozku papoušků. MAM: Df = 6/25; F = 3,412; P = 0,013. Df = stupně volnosti. Plný model, viz tabulka 23. v přílohách.

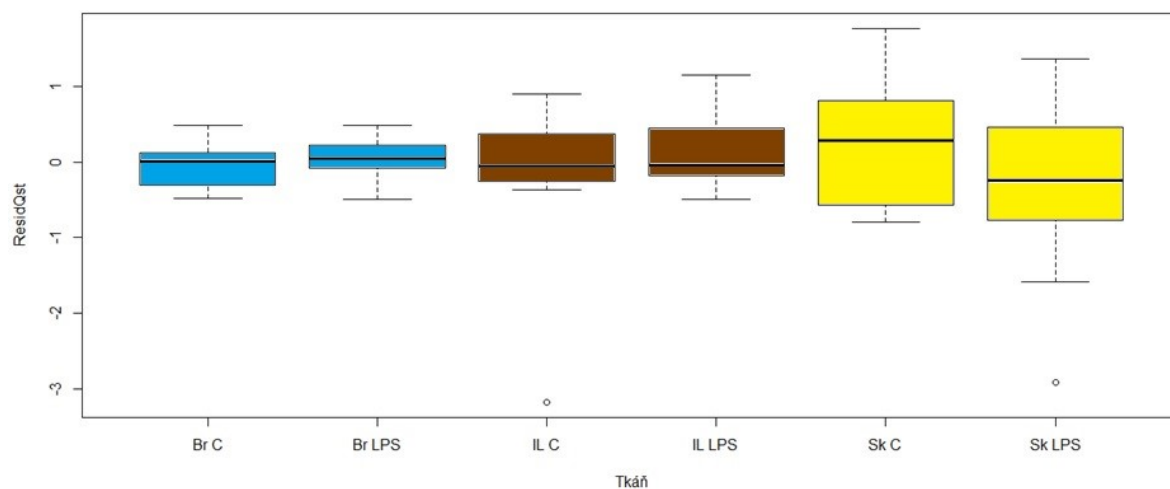
Znak	Df	F hodnota	P hodnota
IL-1β ~ Pohlaví + Druh	6/25	3,412	0,013
Pohlaví	1/26	3,991	0,057
Druh	5/30	2,348	0,071

Tabulka č. 15.: Mezidruhové srovnání relativní exprese (Qst) *CNR1* ve střevě papoušků.
MAM: Df = 6/25; F = 2,443; P = 0,054. Df = stupně volnosti. Várka = skupina ptáků, která byla stimulována v jednom období. Plný model, viz Tabulka č. 24. v přílohách.

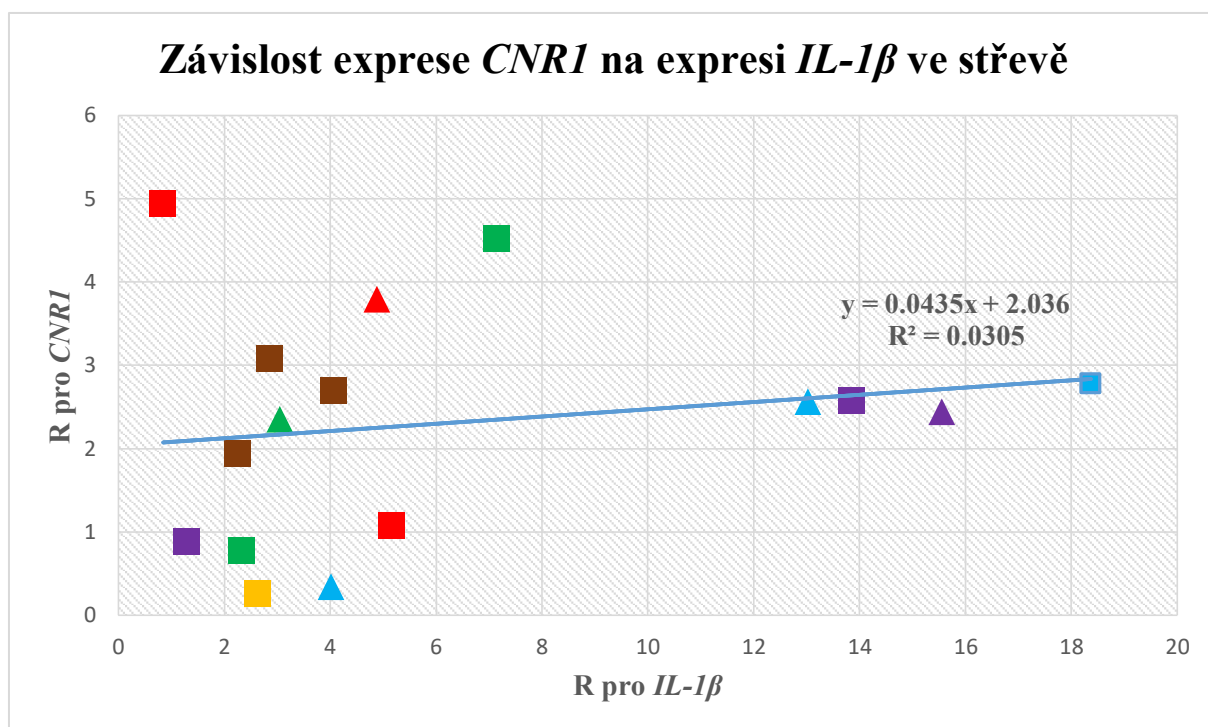
Znak	Df	F hodnota	P hodnota
IL-1 β ~ Pohlaví + Druh + Várka	6/25	2,443	0,054
Pohlaví	1/25	4,771	0,039
Druh	5/25	2,246	0,081

Tabulka č. 16.: Mezidruhové srovnání relativní exprese (Qst) *CNR1* v kůži papoušků.
MAM: Df = 6/25; F = 1,990; P = 0,105. Df = stupně volnosti. Várka = skupina ptáků, která byla stimulována v jednom období. Plný model, viz Tabulka č. 25. v přílohách.

Znak	Df	F hodnota	P hodnota
IL-1 β ~ Stimulace + Druh	6/25	1,990	0,105
Stimulace	1/26	2,323	0,140
Druh	5/30	1,969	0,119

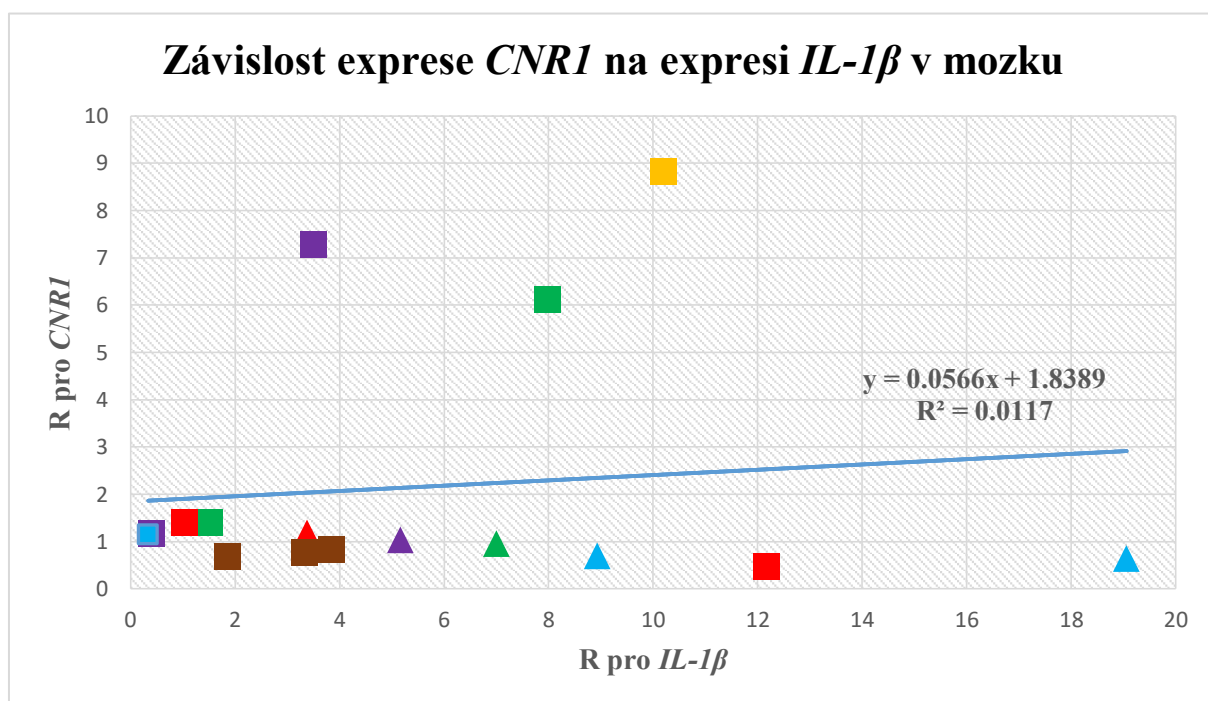


Obrázek č. 10.: Závislost residuálních hodnot Qst vyjadřující míru exprese *CNR1* na stimulaci a typu tkáně. Br C = kontrolní mozek; Br LPS = stimulovaný mozek; IL C = kontrolní střevo; IL LPS = stimulované střevo; Sk C = kontrolní kůže; Sk LPS = stimulovaná kůže



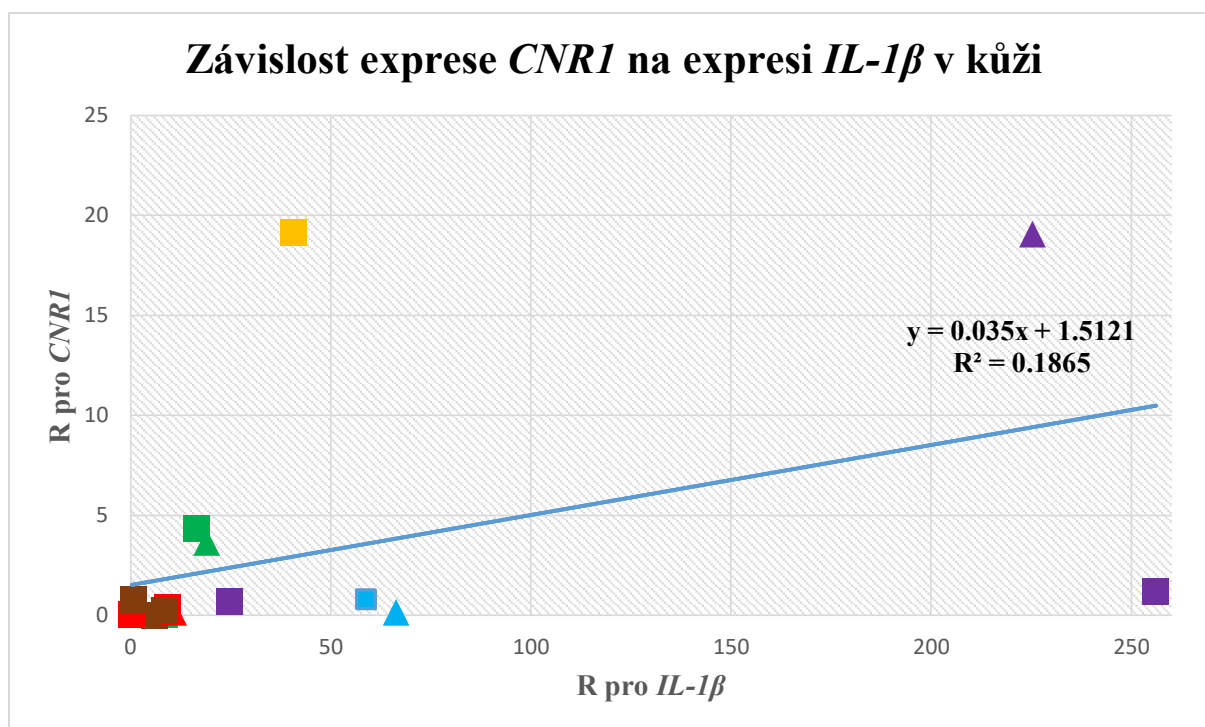
Obrázek č. 11.: Závislost exprese *CNR1* na expresi *IL-1β* v mozku papoušků

Legenda: R = relativní expresní poměr; ■ = samec; △ = samice; červeně *Psephotus haematonotus*; oranžově *Agapornis roseicollis*; modře *Neophema elegans*; zeleně *Melopsittacus undulatus*; hnědě *Nymphicus hollandicus*; fialově *Forpus coelestis*



Obrázek č. 12.: Závislost exprese *CNR1* na expresi *IL-1β* ve střevě papoušků

Legenda: R = relativní expresní poměr; ■ = samec; △ = samice; červeně *Psephotus haematonotus*; oranžově *Agapornis roseicollis*; modře *Neophema elegans*; zeleně *Melopsittacus undulatus*; hnědě *Nymphicus hollandicus*; fialově *Forpus coelestis*



Obrázek č. 13.: Závislost exprese *CNR1* na expresi *IL-1β* ve střevě papoušků

Legenda: R = relativní expresní poměr; ■ = samec; △ = samice; červeně *Psephotus haematonotus*; oranžově *Agapornis roseicollis*; modře *Neophema elegans*; zeleně *Melopsittacus undulatus*; hnědě *Nymphicus hollandicus*; fialově *Forpus coelestis*

4.3. Expres vybraných genů po stimulaci LPS u zebříček

U zebříček je exprese *IL-1β* závislá na tkáni a stimulaci (MAM: Df = 4/83; F = 14,545; P << 0,001; Tabulka č. 17.). Expres *CNR1* pouze na tkáni (MAM: Df = 3/83; F = 44,228; P << 0,001; Tabulka č. 18.) a exprese *CNR2* na tkáni a stimulaci, u které vychází marginálně nesignifikantní vztah (MAM: Df = 4/83; F = 5,075; P = 0,001; Tabulka č. 19.). Z krabicových grafů můžeme vidět zvýšenou expresi *IL-1β* u stimulovaných jedinců pouze v periférii, v mozku a slezině se exprese *IL-1β* nemění (Obrázek č. 14.). Pro *CNR1* nepozorujeme změnu exprese v závislosti na stimulaci (Obrázek č. 15.) a pro *CNR2* vidíme jen velmi mírné snížení exprese u stimulovaných jedinců (Obrázek č. 16). Expres *CNR1* nekoreluje s expresí *IL-1β* v mozku (P = 0,173; r = 0,421; Obrázek č. 17.) a v kůži (P = 0,152; r = 0,440; Obrázek č. 19.). Ve slezině naopak exprese *CNR1* s expresí *IL-1β* silně koreluje (P << 0,001; r = 0,925; Obrázek č. 18.). Taktéž exprese *CNR2* pozitivně koreluje s expresí *IL-1β* v mozku (P = 0,009; r = 0,711; Obrázek č. 20.) a ve slezině (P = 0,002; r = 0,805; Obrázek 21.). V kůži naopak nekoreluje (P = 0,637; r = 0,152; Obrázek 22.).

Tabulka č. 17.: Srovnání relativní exprese (Qst) pro *IL-1 β* u zebřiček. MAM: Df = 4/83; F = 14,545; P << 0,001. Df = stupně volnosti. Plný model, viz Tabulka č. 26. v přílohách.

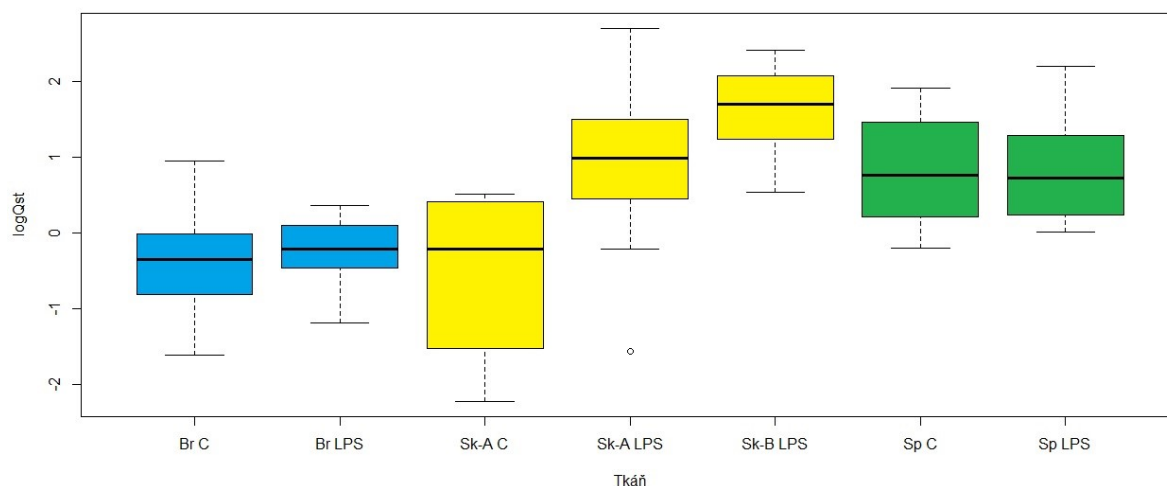
Znak	Df	F hodnota	P hodnota
IL-1β ~ Stimulace + Tkáň	4/83	14,545	<<0,001
Tkáň	3/82	12,921	<<0,001
Stimulace	1/80	7,133	0,009

Tabulka č. 18.: Srovnání relativní exprese (Qst) pro *CNR1* u zebřiček. MAM: Df = 3/83; F = 44,228; P << 0,001. Plný model, viz Tabulka č. 27. v přílohách.

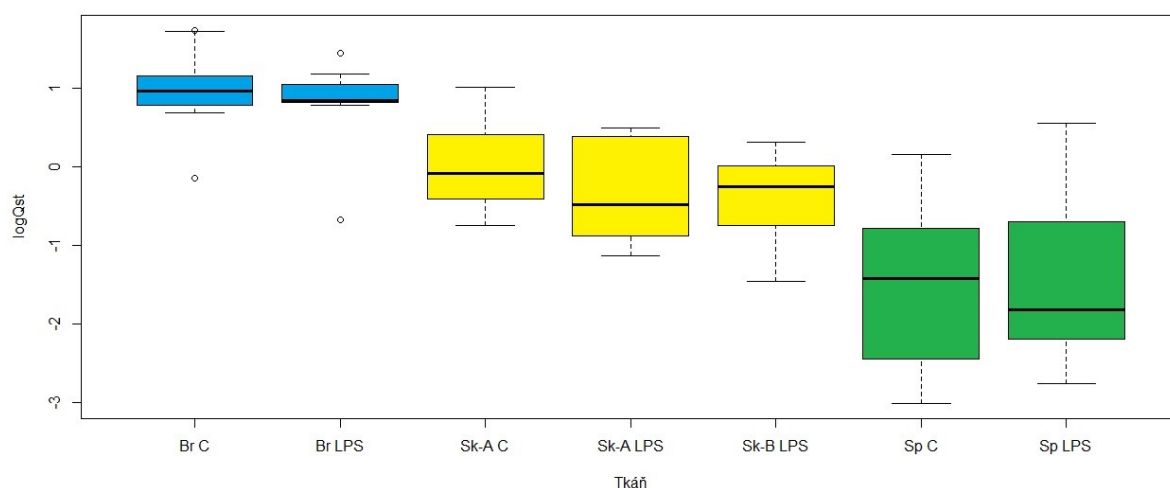
Znak	Df	F hodnota	P hodnota
CNR1 ~ Tkáň	3/83	44,228	<<0,001
Tkáň	3/82	44,108	<<0,001

Tabulka č. 19.: Srovnání relativní exprese (Qst) pro *CNR2* u zebřiček. MAM: Df = 4/83; F = 5,075; P = 0,001. Plný model, viz Tabulka č. 28. v přílohách.

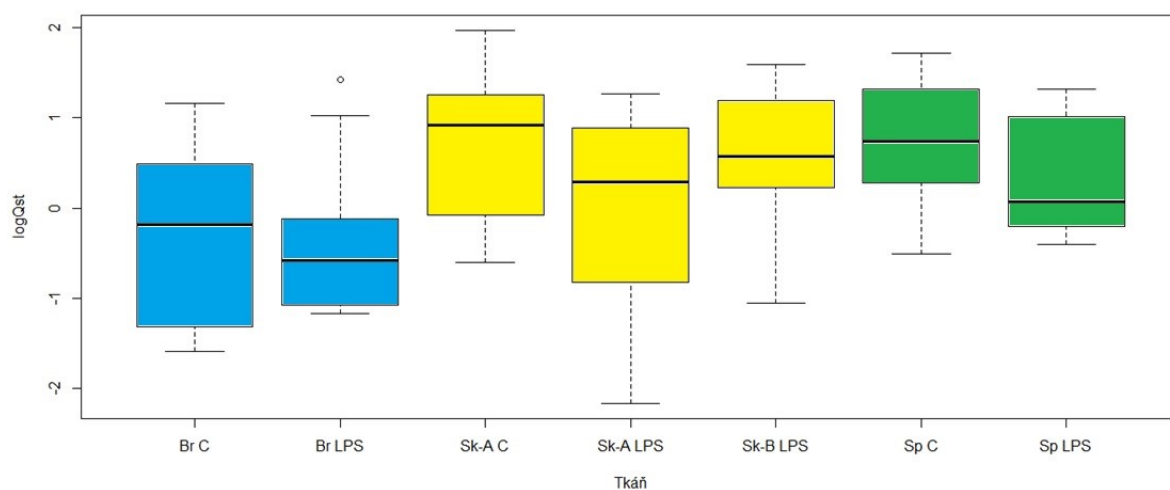
Znak	Df	F hodnota	P hodnota
CNR2 ~ Stimulace + Tkáň	4/83	5,075	0,001
Stimulace	1/80	3,667	0,059
Tkáň	3/82	6,226	<0,001



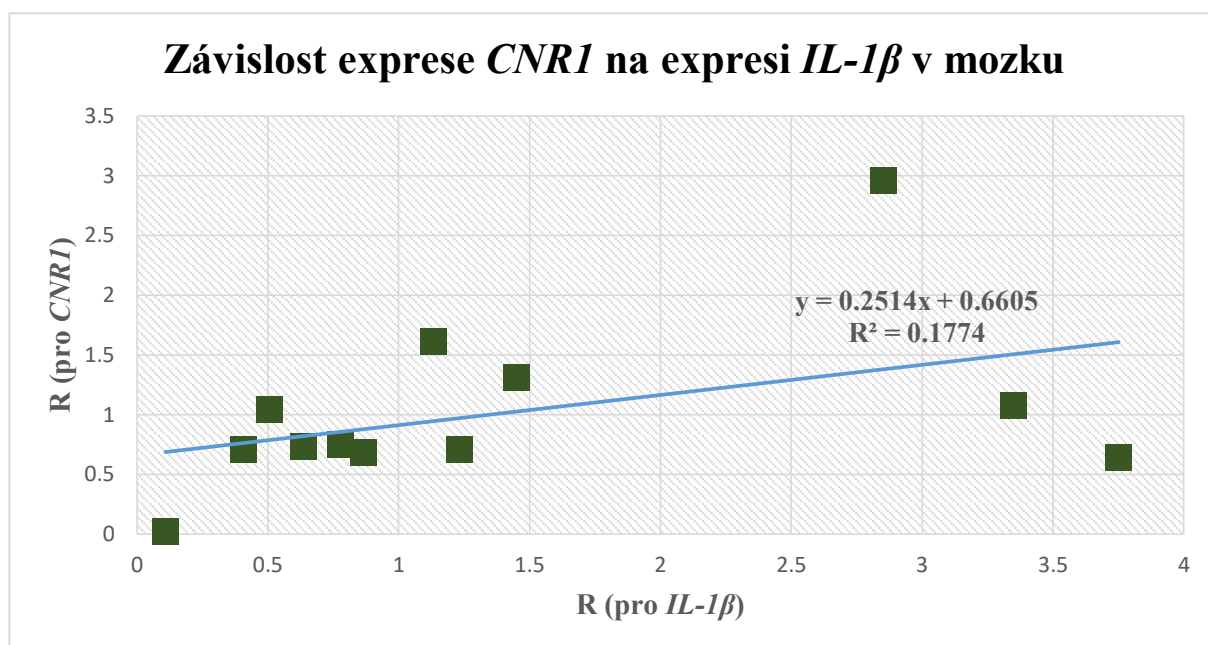
Obrázek č. 14.: Závislost dekadicky zlogaritmovaných hodnot Qst vyjadřující míru exprese *IL-1 β* na stimulaci a typu tkáně. Br C = kontrolní mozek; Br LPS = stimulovaný mozek; Sk-A C = kontrolní kůže (pravé křídlo); SK-A LPS = stimulovaná kůže (pravé křídlo); Sk-B LPS = stimulovaná kůže (levé křídlo); Sp C = kontrolní slezina; Sp LPS = stimulovaná slezina



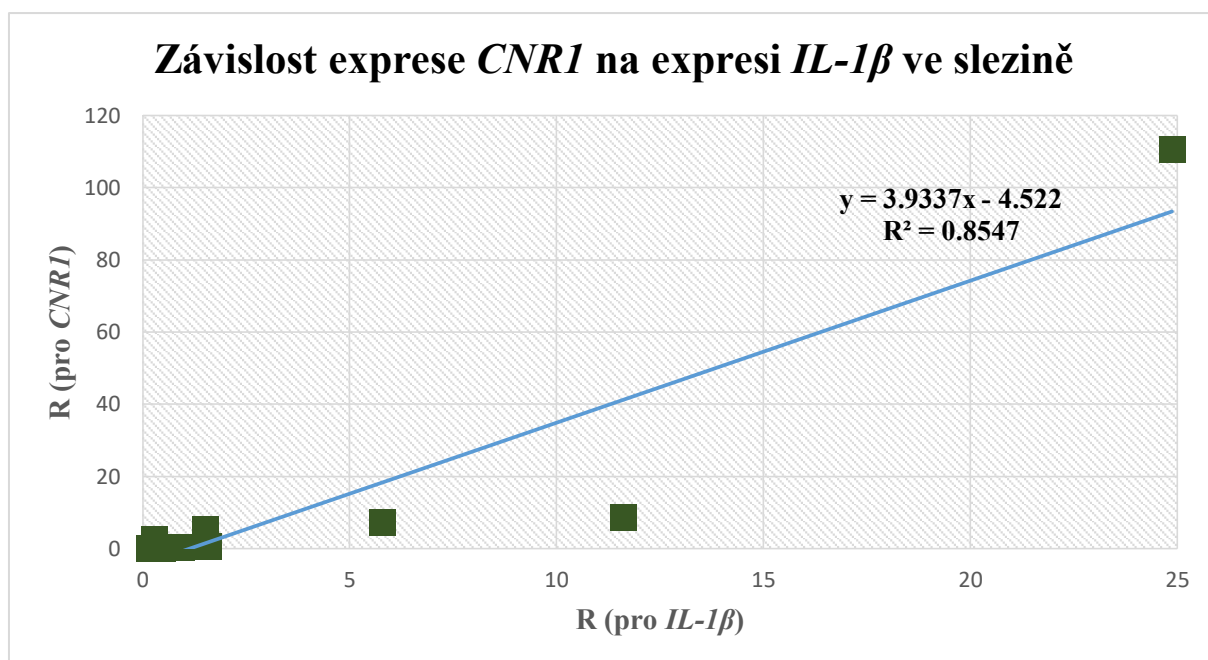
Obrázek č. 15.: Závislost dekadicky zlogaritmovaných hodnot Q_{st} vyjadřující míru exprese *CNR1* na stimulaci a typu tkáně. Br C = kontrolní mozek; Br LPS = stimulovaný mozek; Sk-A C = kontrolní kůže (pravé křídlo); SK-A LPS = stimulovaná kůže (pravé křídlo); Sk-B LPS = stimulovaná kůže (levé křídlo); Sp C = kontrolní slezina; Sp LPS = stimulovaná slezina



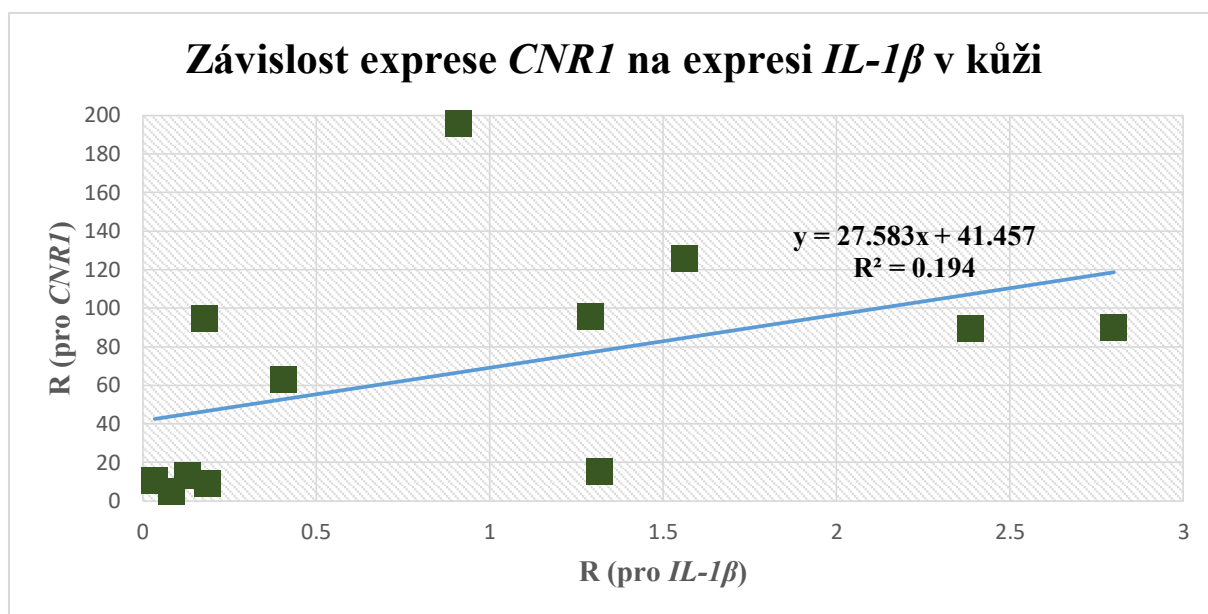
Obrázek č. 16.: Závislost dekadicky zlogaritmovaných hodnot Q_{st} vyjadřující míru exprese *CNR2* na stimulaci a typu tkáně. Br C = kontrolní mozek; Br LPS = stimulovaný mozek; Sk-A C = kontrolní kůže (pravé křídlo); SK-A LPS = stimulovaná kůže (pravé křídlo); Sk-B LPS = stimulovaná kůže (levé křídlo); Sp C = kontrolní slezina; Sp LPS = stimulovaná slezina



Obrázek č. 17.: Závislost exprese *CNR1* na expresi *IL-1 β* v mozku zebřiček
 R = relativní expresní poměr

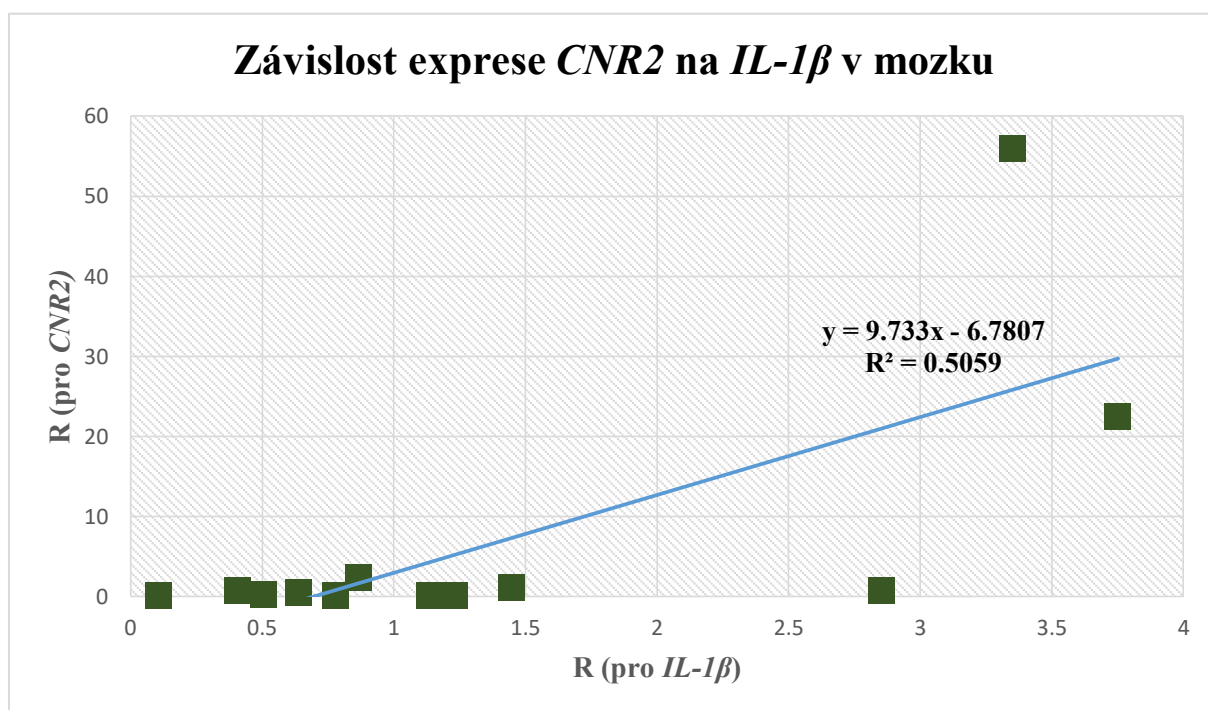


Obrázek č. 18.: Závislost exprese *CNR1* na expresi *IL-1 β* ve slezině zebřiček
 R = relativní expresní poměr



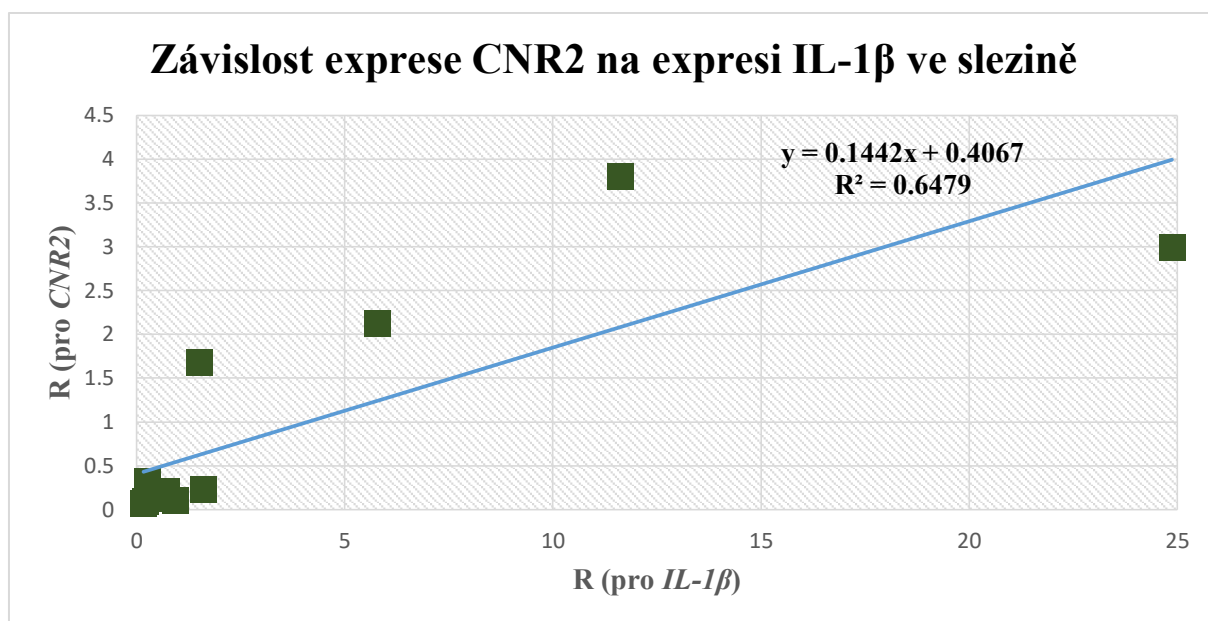
Obrázek č. 19.: Závislost exprese *CNR1* na expresi *IL-1β* v kůži zebříček

R = relativní expresní poměr

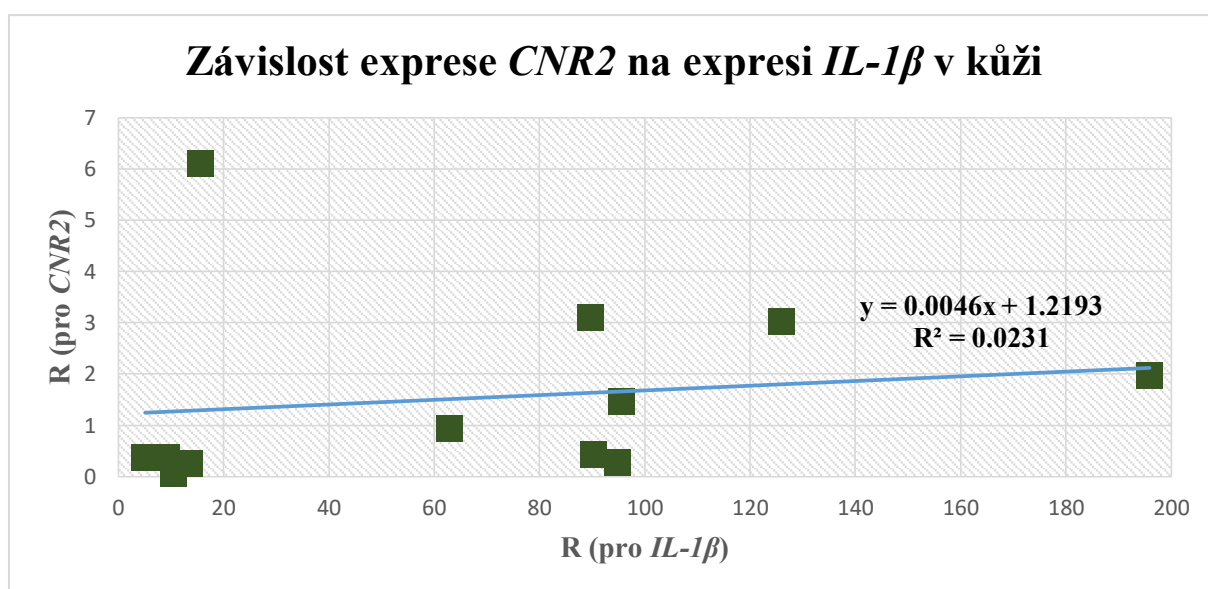


Obrázek č. 20.: Závislost exprese *CNR2* na expresi *IL-1β* v mozku zebříček

R = relativní expresní poměr



Obrázek č. 21.: Závislost exprese *CNR2* na expresi *IL-1β* ve slezině zebřiček
R = relativní expresní poměr



Obrázek č. 22.: Závislost exprese *CNR2* na expresi *IL-1β* v kůži zebřiček
R = relativní expresní poměr

5. Diskuse

Osa střevo-mozek (gut-brain axis) je součástí fenoménu vzájemného ovlivňování nervové a imunitní soustavy, který se v dnešní době zkoumá převážně na člověku. V této práci jsem prokázal jeho význam i u ptáků, především u papoušků, kde u jedinců s indukovaným peritonéálním zánětem byla naměřena vyšší hladina exprese prozánětlivého cytokinu IL-1 β nejen v trávicí soustavě, ale i v mozku. U zebřiček z řádu pěvců tento jev ovšem zaznamenán nebyl. Vliv imunitního systému na CNS se může projevovat změnami chování a kvalitou kognitivních funkcí. Chronický zánět způsobený například změnou vnitřní mikrobioty tak tyto funkce může ovlivňovat. Svojí úlohu v regulaci nervových a imunitních procesů plní také kanabinoidní receptory CB₁ a CB₂, které tak vlastně mohou obě soustavy propojovat. U savců je již popsána jejich role při zánětu, u ptáků jsou celkem dobře popsány neuronální funkce receptoru CB₁, zatímco velmi málo se toho ví o významu receptoru CB₂. Proto jsem se v této práci zaměřil především na expresi těchto dvou receptorů v nervové soustavě a dalších tkáních v průběhu zánětu u ptáků.

Kanabinoidní receptor prvního typu se zřejmě jako u savců vyskytuje v CNS ptáků, dle výsledků se exprimuje v mozku zebřiček i různých druhů papoušků a zřejmě zde také reguluje nervové procesy. Mimo to se v jisté míře exprimuje i v jiných tkáních, které jsem používal k měření: slezina u zebřiček, střevo u papoušků, kůže u zebřiček i papoušků. Kanabinoidní receptor druhého typu se dle výsledků exprimuje pouze u zebřiček a to jak v mozku, tak i ve slezině a v kůži. CB₂ se sice primárně vyskytuje na imunitních buňkách, nicméně i u savců se v menší míře exprimuje i v mozku, konkrétně na mikroglíích, tedy vlastně imunitních buňkách nervového systému (Maresz et al. 2005). Již dříve bylo pomocí radiografie dokázáno, že se CB₂ v mozku papoušků (konkrétně andulek) nevyskytuje (Alonso-Ferrero et al. 2006), což nám ovšem nedokazuje, že se u papoušků nevyskytuje vůbec, například v jiných tkáních. V této práci jsem sekvenoval *CNR2* gen v genomu papoušků pomocí primerů vytvořených na základě konsensu známých sekvencí *CNR2* genů jiných ptačích druhů, viz kapitola 3.3. Výsledný produkt jsem porovnával v genomové databázi NCBI, ale nenašli se žádné shodné skvence odpovídající tomuto genu u papoušků, čili je možné že nejen, že ho neexprimují, ale gen pro tento receptor zřejmě úplně postrádají. Je také možné, že zatím tento gen jen nebyl objeven. Pokud o něj v evoluci přišli, je otázkou, zda se bez tohoto receptoru zcela obejdou proto, že úroveň imunitní regulace tímto receptorem je pro ptáky zanedbatelná, nebo jeho funkci převzala jiná struktura, například CB₁ receptor. V průběhu zánětu by měla fungovat negativní zpětná vazba mezi kanabinoidními receptory druhého typu a prozánětlivými cytokiny, tedy například

zvýšené množství IL-1 β by mělo zvýšit množství CB₂ receptorů, které zase hodnotu IL-1 β sníží (Klein et al. 2003; Maresz et al. 2005). Podíváme-li se na rozdíl v expresi *CNR1* u papoušků a zebříček a *CNR2* u zebříček mezi kontrolními jedinci a jedinci, jejichž imunitní systém je stimulován LPS, vidíme, že k výrazné změně v expresi nedochází ani u jednoho z kanabinoidních receptorů. U CB₁ to je očekávatelné, jelikož by se neměl účastnit imunitních procesů. U papoušků je nejvýznamnějším faktorem ovlivňující expresi *CNR1* v mozku a ve střevě pohlaví jedince. To odpovídá tomu, že pohlavní hormony by měly mít vliv na expresi tohoto receptoru (González et al. 2000). V kůži papoušků je ovšem CB₁ receptor ovlivněn stimulací (marginálně nesignifikantně), jejímž vlivem se exprese *CNR1* mírně snižuje. Je možné, že CB₁ receptor se zde účastní signalizace na imunitních buňkách, místo CB₂ receptoru, který právě u papoušků chybí. Změna v množství tohoto receptoru pak může být vysvětlena migrací a aktivitou leukocytů v důsledku systémové odpovědi. CB₂ receptory, které by měly snižovat množství prozánětlivých cytokinů v pozdějších fázích zánětu, se u zebříček výrazně nemění. Stimulace má velmi malý vliv, míra exprese *CNR2* se jen mírně snižuje ve slezině, kůži i mozku. Je ovšem otázkou, v jaké fázi zánětu se zrovna pohybujeme. Během zánětu se zvyšuje množství prozánětlivých cytokinů, které by měly mít vliv na zvýšení exprese *CNR2*. U zebříček neznáme časovou dynamiku této kaskády. Význam může mít také LPS použitý pro stimulaci imunitního systému. Dle Carlisle et al. 2002 závisí změna exprese kanabinoidních receptorů druhého typu u myši na typu stimulantu, přičemž bakteriální LPS neměl tak výrazný účinek jako jiné látky a dokonce expresi *CNR2* snižuje.

Co se týče exprese prozánětlivého cytokinu IL-1 β , je nejvýznamnějším faktorem změny jeho exprese u papoušků i zebříček právě stimulace bakteriálním LPS. Zvýšení vidíme v periférii u zebříček i papoušků, což je pravděpodobně způsobeno vyšším počtem aktivovaných leukocytů produkujících tento cytokin v průběhu systémového zánětu, jak jsem již uvažoval v souvislosti se změnou exprese *CNR1*. U papoušků navíc vidíme zvýšení exprese tohoto cytokinu nejen v perifériích a ve střevě, ale i v mozku, což je zajímavý poznatek právě z pohledu osy střev-mozek, tedy že zánět v trávicí soustavě může mít takovýto vliv na CNS, v tomto případě na změnu exprese genů, kupříkladu právě genů prozánětlivých cytokinů, což může nervové procesy ovlivňovat. Změna exprese *IL-1 β* ovšem neprobíhá u zebříček, kde se s intraperitoneální stimulací množství IL-1 β v mozku nezvyšuje. To může být způsobeno jinou časovou dynamikou zánětu u zebříček a papoušků, ale také je třeba brát v potaz potenciální absenci CB₂ u papoušků a roli tohoto receptoru v regulaci zánětu. Je možné, že absence CB₂ u papoušků má vliv na zvýšené množství IL-1 β v mozku, kdežto u zebříček tento receptor svým inhibičním efektem zánět v mozku tlumí. Na regulaci zánětu se ovšem podílí mnoho faktorů, a

tak je otázkou, zda zrovna CB₂ může mít v tomto ohledu i v nervové soustavě tak velkou roli. Víme, že například u CB₂ deficientních myší nastávali imunopatologie způsobené vyšším množstvím prozánětlivých cytokinů, jejichž exprese pravděpodobně nebyla tímto receptorem regulována (Karmaus et al. 2013). Tento faktor tedy může hrát roli i u papoušků, kteří o tento receptor mohli během evoluce přijít. Vzhledem k množství významnějších signalizačních drah podílejících se na regulaci zánětu (TLR, JAK/STAT, NF-κB...), nelze s jistotou tvrdit, že by se absence zrovna tohoto jednoho receptoru projevovala tímto způsobem, nicméně je potřeba to brát v potaz. Je také možné, že regulace exprese prozánětlivých cytokinů CB₂ receptorem u ptáků nemá až takový význam a proto jsou papoušci schopni se bez něj obejít a přežít zánětlivou odpověď se zvýšenou hladinou prozánětlivých cytokinů, která ovšem není letální. Exprese *CNR1* nekoreluje s expresí *IL-1β* v mozku u zebřiček i papoušků, ve střevě papoušků a v kůži zebřiček. Exprese *CNR1* v kůži papoušků a exprese *CNR1* a *CNR2* ve slezině zebřiček pozitivně koreluje s expresí *IL-1β*, což pravděpodobně souvisí s aktivitou leukocytů v periférii a lymfatických orgánech. Dále můžeme vidět vztah mezi expresí *CNR2* a *IL-1β* v mozku zebřiček, který ovšem pravděpodobně nesouvisí se zánětem. Dané korelace mohou značit spíše nezávislost exprese těchto dvou genů na sobě, přičemž vliv může mít na tomto jevu nízký počet jedinců a fakt, že nám zatím chybí časový aspekt zánětu v mozku, čili v dané fázi se tyto dva geny ovlivňovat nemusí.

Veskrze negativní výsledky související s vlivem zánětu na expresi kanabinoidních receptorů mohou samozřejmě značit jejich malý vliv na průběh a regulaci zánětu, nicméně je důležité také brát v potaz další faktory, jako například nízký počet jedinců, což mohlo ovlivnit statistickou analýzu a finální hodnoty. Jednalo se ovšem o pilotní experimenty, které byly navrženy na menších počtech jedinců, ale s cílem získat co nejvíce iniciálních výsledků. Zároveň není známo, v jaké fázi zánětu v mozku jsme v okamžiku 24 hodin od aplikace LPS. Časová dynamika je u ptáků navržena pro průběh zánětu v kůži (Martin et al. 2006). Podle této dynamiky jsme zvolili dobu 24 hodin pro měření. Je ovšem možné, že v ptačím mozku je tato dynamika odlišná. Z předešlých experimentů na savcích je vidět, že se exprese CB₂ výrazně mění i několik dní po stimulaci (Maresz et al. 2005). Je tak možné, že 24 hodin nestačí k výrazné změně v množství CB₂, i když u ptáků může stimulace působit v jiných časových rovinách, než u savců. Dalším faktorem mohlo být dávkování stimulantu. Co se týče LPS, dokáže i malá dávka vyvolat viditelné změny související se imunitní odpovědí, a to i u ptáků, čili dávka podaná v těchto experimentech by měla být dostatečná a měla by v podstatě vyvolat reakci odpovídající přirozené stimulaci, se kterou se organismus v přírodě může setkat (Armour et al. 2020). Množství IL-1β by tedy mělo být přímo úměrné s dávkou LPS, což se také víceméně

potvrdilo. Dle Carlisle et al. 2002 dochází po stimulaci LPS u myší 12 a 24 h spíše ke snížení exprese CB₂, přičemž u CB₁ k žádné razantní změně nedochází. U ptáků je tedy možný podobný průběh, tedy v prvních fázích zánětu po stimulaci snížení exprese, respektive žádná změna v expresi CB₂ a výrazné zvýšení exprese prozánětlivých cytokinů, jejichž vysoká koncentrace zvyšuje expresi CB₂ až v pozdních fázích zánětu, do které se pravděpodobně pokusná zvířata v těchto experimentech nedostala. Pozitivní je, že vidíme, jak akutní stimulace v peritoneu dokáže vyvolat systematickou reakci, včetně reakce v mozku. Proto by bylo v budoucnu dobré prozkoumat i časový vliv na průběh zánětu a expresi genů nejen kanabinoidních receptorů, ale i různých prozánětlivých cytokinů a jejich působení v mozku v různé časové škále od indukce střevního zánětu. Přírozený peritoneální zánět může být vyvolán například změnou ve složení přirozené střevní mikrobioty. V reakci na to dochází ke zvýšení prozánětlivých cytokinů nejen v gastrointestinálním traktu, ale i v CNS. Role kanabinoidního systému v imunitě a především v regulaci kognitivních funkcí u savců je jistě významná a předpoklad byl, že tomu tak bude i u ptáků (Fowler et al. 2001). Změna v množství CB₁ může mít vliv na kognitivní funkce, nicméně v této práci se neprokázal výrazný vliv zánětu na změnu exprese těchto receptorů u papoušků a pěvců. Potenciální absence CB₂ receptoru u jedné ptačí skupiny ukazuje, že regulace imunitních procesů tímto systémem může být nevýznamná. Je otázka, zda tento receptor chybí i u jiných skupin, ať už savčích, nebo ptačích, a jaký vliv to má na průběh jejich zánětlivé odpovědi a například na výskytu imunopatologií.

6. Závěr

Cílem této práce bylo popsat změny v expresi kanabinoidních receptorů (CB₁ a CB₂) a prozánětlivého cytokinu IL-1 β v mozku a dalších tkáních v souvislosti s indukovaným peritoneálním zánětem a prokázat tak význam osy střevo-mozek u kognitivně pokročilých skupin ptáků, konkrétně pěvců (zebříček) a papoušků, a vliv zánětu na expresi kanabinoidních receptorů a tedy potenciální změnu regulace kognitivních funkcí. Papoušci zřejmě úplně postrádají gen pro CB₂, což je zajímavé z pohledu imunitní regulace, kde funkci tohoto receptoru může nahrazovat CB₁. Vliv stimulace na expresi CB₁ se neprokázal u zebříček a u papoušků je pravděpodobný vliv stimulace pouze v periférii, což by mohlo značit výskyt těchto receptorů na leukocytech. Nepodařilo se ani prokázat vliv stimulace na expresi CB₂ u zebříček. Prozánětlivý cytokin IL-1 β zvyšuje svojí expresi v místě zánětu a v perifériích u zebříček i papoušků. U papoušků se jeho exprese u stimulovaných jedinců zvyšuje také v mozku, což potvrzuje význam regulační dráhy střevo-mozek. Tento rozdíl může být také vysvětlen absencí právě CB₂ receptorů u papoušků, která má u nich za následek zvýšenou hladinu IL-1 β , nebo nevýznamností imunitní regulace kanabinoidním systémem u ptáků, či rozdílnou dynamikou zánětu u papoušků a zebříček. Proto by bylo v budoucnu zajímavé porovnat přítomnost genu pro kanabinoidní receptor u více skupin ptáků, ale i savců a zjistit, v jakých procesech a signálních drahách se účastní a také průběh zánětlivé odpovědi v různých časových úrovních.

7. Seznam zkratek

ACTH	adrenokortikotropní hormon
ATP	adenosintrifosfát
CB	kanabinoidní recptor
CNR	gen pro kanabinoidní receptor
CNS	centrální nervová soustava
CRH	hormon uvolňující kortikotropin (corticotropin realising hormone)
CSF	mozkomíšní mok (cerebrospinal fluid)
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline pufr
ECS	endokanabinoidní systém
F	přední primer (forward)
FAAH	hydrolázá amidů mastných kyselin (fatty acid amide hydrolase)
HPA	stresová osa (hypothalamus, pituitary gland, adrenal glands)
IL	interleukin
JAK	Janusova kináza
LPS	bakteriální lipopolysacharid
MAM	minimální adekvátní model
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF- κ B	nukleární faktor kappa B
R	zadní primer (reverse)
STAT	signal transducer an aktivátor of transcription
THC	tetrahydrokanabinol
TNF	tumor necrosis factor

8. Literatura

- Acharya, Nandini, Sasi Penukonda, Tatiana Shcheglova, Adam T. Hagymasi, Sreyashi Basu, and Pramod K. Srivastava. 2017. 'Endocannabinoid System Acts as a Regulator of Immune Homeostasis in the Gut'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114 (19): 5005–10. <https://doi.org/10.1073/pnas.1612177114>.
- Aguilera, M., P. Vergara, and V. Martínez. 2013. 'Stress and Antibiotics Alter Luminal and Wall-Adhered Microbiota and Enhance the Local Expression of Visceral Sensory-Related Systems in Mice'. *Neurogastroenterology & Motility* 25 (8): e515–29. <https://doi.org/10.1111/nmo.12154>.
- Alonso-Ferrero, M.E., M.A. Paniagua, R. Mostany, F. Pilar-Cuéllar, R. Díez-Alarcia, A. Pazos, and A. Fernández-López. 2006. 'Cannabinoid System in the Budgerigar Brain'. *Brain Research* 1087 (1): 105–13. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.02.119>.
- Andrei, C., P. Margiocco, A. Poggi, L. V. Lotti, M. R. Torrìsi, and A. Rubartelli. 2004. 'From The Cover: Phospholipases C and A2 Control Lysosome-Mediated IL-1 Secretion: Implications for Inflammatory Processes'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (26): 9745–50. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308558101>.
- Armour, Ellen M., Taylor L. Bruner, Justin K. Hines, and Michael W. Butler. 2020. 'Low-Dose Immune Challenges Result in Detectable Levels of Oxidative Damage'. *The Journal of Experimental Biology* 223 (6): jeb220095. <https://doi.org/10.1242/jeb.220095>.
- Ben-Sasson, Shlomo Z., Jane Hu-Li, Juan Quiel, Stephane Cauchetaux, Maya Ratner, Ilana Shapira, Charles A. Dinarello, and William E. Paul. 2009. 'IL-1 Acts Directly on CD4 T Cells to Enhance Their Antigen-Driven Expansion and Differentiation'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (17): 7119–24. <https://doi.org/10.1073/pnas.0902745106>.
- Berkenbosch, F, J van Oers, A del Rey, F Tilders, and H Besedovsky. 1987. 'Corticotropin-Releasing Factor-Producing Neurons in the Rat Activated by Interleukin-1'. *Science* 238 (4826): 524–26. <https://doi.org/10.1126/science.2443979>.
- Bird, Steve, Jun Zou, Tiehui Wang, Barry Munday, Charlie Cunningham, and Chris J Secombes. 2002. 'Evolution of Interleukin-1 β '. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 13 (6): 483–502. [https://doi.org/10.1016/S1359-6101\(02\)00028-X](https://doi.org/10.1016/S1359-6101(02)00028-X).
- Borovikova, Lyudmila V., Svetlana Ivanova, Minghuang Zhang, Huan Yang, Galina I. Botchkina, Linda R. Watkins, Haichao Wang, Naji Abumrad, John W. Eaton, and

- Kevin J. Tracey. 2000. 'Vagus Nerve Stimulation Attenuates the Systemic Inflammatory Response to Endotoxin'. *Nature* 405 (6785): 458–62. <https://doi.org/10.1038/35013070>.
- Cani, Patrice D., Hubert Plovier, Matthias Van Hul, Lucie Geurts, Nathalie M. Delzenne, Céline Druart, and Amandine Everard. 2016. 'Endocannabinoids — at the Crossroads between the Gut Microbiota and Host Metabolism'. *Nature Reviews Endocrinology* 12 (3): 133–43. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2015.211>.
- Carlisle, S. J., F. Marciano-Cabral, A. Staab, C. Ludwick, and G. A. Cabral. 2002. 'Differential Expression of the CB2 Cannabinoid Receptor by Rodent Macrophages and Macrophage-like Cells in Relation to Cell Activation'. *International Immunopharmacology* 2 (1): 69–82.
- Ceccarini, Jenny, Cindy Casteels, Rawaha Ahmad, Melissa Crabbé, Laura Van de Vliet, Heleen Vanhaute, Mathieu Vandenbulcke, Wim Vandenberghe, and Koen Van Laere. 2019. 'Regional Changes in the Type 1 Cannabinoid Receptor Are Associated with Cognitive Dysfunction in Parkinson's Disease'. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 46 (11): 2348–57. <https://doi.org/10.1007/s00259-019-04445-x>.
- Chryssikopoulos, Athanassios. 1997. 'The Relationship between the Immune and Endocrine Systems'. *Annals of the New York Academy of Sciences* 816 (1 Adolescent Gy): 83–93. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1997.tb52132.x>.
- Cristino, Luigia, Thorsten Becker, and Vincenzo Di Marzo. 2014. 'Endocannabinoids and Energy Homeostasis: An Update: Regulatory Role of Endocannabinoids in Obesity'. *BioFactors* 40 (4): 389–97. <https://doi.org/10.1002/biof.1168>.
- Cunningham, E. T., E. Wada, D. B. Carter, D. E. Tracey, J. F. Battey, and E. B. De Souza. 1992. 'In Situ Histochemical Localization of Type I Interleukin-1 Receptor Messenger RNA in the Central Nervous System, Pituitary, and Adrenal Gland of the Mouse'. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 12 (3): 1101–14.
- DeVries, M. Susan, Melissa A. Cordes, Jonathan D. Rodriguez, Sharon A. Stevenson, and Lauren V. Riters. 2016. 'Neural Endocannabinoid CB1 Receptor Expression, Social Status, and Behavior in Male European Starlings'. *Brain Research* 1644 (August): 240–48. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.05.031>.
- Di Marzo, V. 2006. 'Endocannabinoid Overactivity and Intestinal Inflammation'. *Gut* 55 (10): 1373–76. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.090472>.

- Dinarello, Charles A. 2011. 'Interleukin-1 in the Pathogenesis and Treatment of Inflammatory Diseases'. *Blood* 117 (14): 3720–32. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-07-273417>.
- Domenici, M. R. 2006. 'Cannabinoid Receptor Type 1 Located on Presynaptic Terminals of Principal Neurons in the Forebrain Controls Glutamatergic Synaptic Transmission'. *Journal of Neuroscience* 26 (21): 5794–99. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0372-06.2006>.
- Elphick, Maurice R. 2012. 'The Evolution and Comparative Neurobiology of Endocannabinoid Signalling'. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 367 (1607): 3201–15. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0394>.
- Esfandyari, Tuba, Michael Camilleri, Irene Busciglio, Duane Burton, Kari Baxter, and Alan R. Zinsmeister. 2007. 'Effects of a Cannabinoid Receptor Agonist on Colonic Motor and Sensory Functions in Humans: A Randomized, Placebo-Controlled Study'. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 293 (1): G137–45. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00565.2006>.
- Fowler, Christopher J., Olov Nilsson, Mikael Andersson, Graham Disney, Stig O. P. Jacobsson, and Gunnar Tiger. 2001. 'Pharmacological Properties of Cannabinoid Receptors in the Avian Brain: Similarity of Rat and Chicken Cannabinoid1 Receptor Recognition Sites and Expression of Cannabinoid2 Receptor-Like Immunoreactivity in the Embryonic Chick Brain'. *Pharmacology and Toxicology* 88 (4): 213–22. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0773.2001.d01-107.x>.
- Galiègue, S., S. Mary, J. Marchand, D. Dussossoy, D. Carrière, P. Carayon, M. Bouaboula, D. Shire, G. Le Fur, and P. Casellas. 1995. 'Expression of Central and Peripheral Cannabinoid Receptors in Human Immune Tissues and Leukocyte Subpopulations'. *European Journal of Biochemistry* 232 (1): 54–61.
- Giulian, D. 1986. 'Interleukin 1 of the Central Nervous System Is Produced by Ameboid Microglia'. *Journal of Experimental Medicine* 164 (2): 594–604. <https://doi.org/10.1084/jem.164.2.594>.
- González, S., T. Bisogno, T. Wenger, J. Manzanares, A. Milone, F. Berrendero, V. Di Marzo, J.A. Ramos, and J.J. Fernández-Ruiz. 2000. 'Sex Steroid Influence on Cannabinoid CB1 Receptor mRNA and Endocannabinoid Levels in the Anterior Pituitary Gland'. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 270 (1): 260–66. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2406>.

- Greenwood-Van Meerveld, Beverley, ed. 2017. *Gastrointestinal Pharmacology*. Vol. 239. Handbook of Experimental Pharmacology. Cham: Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-56360-2>.
- Hanada, Toshitatsu, and Akihiko Yoshimura. 2002. 'Regulation of Cytokine Signaling and Inflammation'. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 13 (4–5): 413–21. [https://doi.org/10.1016/S1359-6101\(02\)00026-6](https://doi.org/10.1016/S1359-6101(02)00026-6).
- Hasenoehrl, C., U. Taschler, M. Storr, and R. Schicho. 2016. 'The Gastrointestinal Tract - a Central Organ of Cannabinoid Signaling in Health and Disease'. *Neurogastroenterology & Motility* 28 (12): 1765–80. <https://doi.org/10.1111/nmo.12931>.
- Herkenham, M., A. B. Lynn, M. D. Little, M. R. Johnson, L. S. Melvin, B. R. de Costa, and K. C. Rice. 1990. 'Cannabinoid Receptor Localization in Brain'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (5): 1932–36.
- Herkenham, M, Ab Lynn, Mr Johnson, Ls Melvin, Br de Costa, and Kc Rice. 1991. 'Characterization and Localization of Cannabinoid Receptors in Rat Brain: A Quantitative in Vitro Autoradiographic Study'. *The Journal of Neuroscience* 11 (2): 563–83. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.11-02-00563.1991>.
- Herkenham, Miles. 1992. 'Cannabinoid Receptor Localization in Brain: Relationship to Motor and Reward Systems'. *Annals of the New York Academy of Sciences* 654 (1 The Neurobiol): 19–32. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1992.tb25953.x>.
- Hořejší, Václav, Jiřina Bartůňková, Tomáš Brdicka, and Radek Špišek. 2017. *Základy imunologie*.
- Karmaus, Peer W. F., Weimin Chen, Robert Crawford, Barbara L. F. Kaplan, and Norbert E. Kaminski. 2013. 'Δ9-Tetrahydrocannabinol Impairs the Inflammatory Response to Influenza Infection: Role of Antigen-Presenting Cells and the Cannabinoid Receptors 1 and 2'. *Toxicological Sciences* 131 (2): 419–33. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs315>.
- Kelley, Keith W., and Robert H. McCusker. 2014. 'Getting Nervous about Immunity'. *Seminars in Immunology* 26 (5): 389–93. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.01.011>.
- Klein, Thomas W., Catherine A. Newton, Noryia Nakachi, and Herman Friedman. 2000. 'Δ⁹-Tetrahydrocannabinol Treatment Suppresses Immunity and Early IFN-γ, IL-12, and IL-12 Receptor B2 Responses to *Legionella Pneumophila* Infection'. *The Journal of Immunology* 164 (12): 6461–66. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.12.6461>.

- Klein, Thomas W., Cathy Newton, Kellie Larsen, Lily Lu, Izabella Perkins, Liang Nong, and Herman Friedman. 2003. 'The Cannabinoid System and Immune Modulation'. *Journal of Leukocyte Biology* 74 (4): 486–96. <https://doi.org/10.1189/jlb.0303101>.
- Kook, A.I., A. Mizruchin, N. Odnopozov, H. Gershon, and Y. Segev. 1995. 'Depression and Immunity: The Biochemical Interrelationship between the Central Nervous System and the Immune System'. *Biological Psychiatry* 37 (11): 817–19. [https://doi.org/10.1016/0006-3223\(95\)00038-I](https://doi.org/10.1016/0006-3223(95)00038-I).
- Krebs, Marie-Odile, Oussama Kebir, and Therese M. Jay. 2019. 'Exposure to Cannabinoids Can Lead to Persistent Cognitive and Psychiatric Disorders'. *European Journal of Pain*, March. <https://doi.org/10.1002/ejp.1377>.
- Krustev, Eugene, Milind M. Muley, and Jason J. McDougall. 2017. 'Endocannabinoids Inhibit Neurogenic Inflammation in Murine Joints by a Non-Canonical Cannabinoid Receptor Mechanism'. *Neuropeptides* 64 (August): 131–35. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2016.08.007>.
- Lindsey, Lindsey Phillips, Cedrick Maceo Daphney, Aboagyewaah Oppong-Damoah, Peter Nikolaevich Uchakin, Sarah E. Abney, Olga N. Uchakina, Richard Darien Khusial, Ayman Akil, and Kevin Sean Murnane. 2019. 'The Cannabinoid Receptor 2 Agonist, β -Caryophyllene, Improves Working Memory and Reduces Circulating Levels of Specific Proinflammatory Cytokines in Aged Male Mice'. *Behavioural Brain Research* 372 (October): 112012. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112012>.
- Lu, Hui-Chen, and Ken Mackie. 2016. 'An Introduction to the Endogenous Cannabinoid System'. *Biological Psychiatry* 79 (7): 516–25. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.07.028>.
- Madden, Kelley S. 2003. 'Catecholamines, Sympathetic Innervation, and Immunity'. *Brain, Behavior, and Immunity* 17 Suppl 1 (February): S5-10.
- Maranduba, Carlos Magno da Costa, Sandra Bertelli Ribeiro De Castro, Gustavo Torres de Souza, Cristiano Rossato, Francisco Carlos da Guia, Maria Anete Santana Valente, João Vitor Paes Rettore, et al. 2015. 'Intestinal Microbiota as Modulators of the Immune System and Neuroimmune System: Impact on the Host Health and Homeostasis'. *Journal of Immunology Research* 2015: 1–14. <https://doi.org/10.1155/2015/931574>.
- Maresz, Katarzyna, Erica J. Carrier, Eugene D. Ponomarev, Cecilia J. Hillard, and Bonnie N. Dittel. 2005. 'Modulation of the Cannabinoid CB2 Receptor in Microglial Cells in

- Response to Inflammatory Stimuli'. *Journal of Neurochemistry* 95 (2): 437–45.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03380.x>.
- Martin, L. B., P. Han, J. Lewittes, J. R. Kuhlman, K. C. Klasing, and M. Wikelski. 2006. 'Phytohemagglutinin-Induced Skin Swelling in Birds: Histological Support for a Classic Immunoecological Technique'. *Functional Ecology* 20 (2): 290–99.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2006.01094.x>.
- McPartland, John, Vincenzo Di Marzo, Luciano De Petrocellis, Alison Mercer, and Michelle Glass. 2001. 'Cannabinoid Receptors Are Absent in Insects'. *The Journal of Comparative Neurology* 436 (4): 423–29. <https://doi.org/10.1002/cne.1078>.
- Meager, A. 1999. 'Cytokine Regulation of Cellular Adhesion Molecule Expression in Inflammation'. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 10 (1): 27–39.
[https://doi.org/10.1016/S1359-6101\(98\)00024-0](https://doi.org/10.1016/S1359-6101(98)00024-0).
- Nestler, Eric J. 2009. *Molecular Neuropharmacology: A Foundation for Clinical Neuroscience*. New York: McGraw-Hill Medical. <http://site.ebrary.com/id/10251590>.
- Pattij, Tommy, Joost Wiskerke, and Anton N.M. Schoffeleer. 2008. 'Cannabinoid Modulation of Executive Functions'. *European Journal of Pharmacology* 585 (2–3): 458–63. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.02.099>.
- Pfaffl, M. W. 2001. 'A New Mathematical Model for Relative Quantification in Real-Time RT-PCR'. *Nucleic Acids Research* 29 (9): 45e–445.
<https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>.
- Phelps, Christopher, ed. 2008. *Cytokines and the Brain*. Neuroimmune Biology 6. Amsterdam: Elsevier.
- Procaccini, Claudio, Valentina Pucino, Veronica De Rosa, Gianni Marone, and Giuseppe Matarese. 2014. 'Neuro-Endocrine Networks Controlling Immune System in Health and Disease'. *Frontiers in Immunology* 5 (April).
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00143>.
- Ransohoff, Richard M., Pia Kivisäkk, and Grahame Kidd. 2003. 'Three or More Routes for Leukocyte Migration into the Central Nervous System'. *Nature Reviews Immunology* 3 (7): 569–81. <https://doi.org/10.1038/nri1130>.
- Ren, Ke, and Richard Torres. 2009. 'Role of Interleukin-1 β during Pain and Inflammation'. *Brain Research Reviews* 60 (1): 57–64.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2008.12.020>.
- Rider, Peleg, Yaron Carmi, Ofer Guttman, Alex Braiman, Idan Cohen, Elena Voronov, Malka R. White, Charles A. Dinarello, and Ron N. Apte. 2011. 'IL-1 α and IL-1 β Recruit

- Different Myeloid Cells and Promote Different Stages of Sterile Inflammation'. *The Journal of Immunology* 187 (9): 4835–43. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102048>.
- Robinson, Rebecca H., Joseph J. Meissler, Xiaoxuan Fan, Daohai Yu, Martin W. Adler, and Toby K. Eisenstein. 2015. 'A CB2-Selective Cannabinoid Suppresses T-Cell Activities and Increases Tregs and IL-10'. *Journal of Neuroimmune Pharmacology* 10 (2): 318–32. <https://doi.org/10.1007/s11481-015-9611-3>.
- Rogers, Malcolm P., Devendra Dubey, and Peter Reich. 1979. 'The Influence of the Psyche and the Brain on Immunity and Disease Susceptibility: A Critical Review'. *Psychosomatic Medicine* 41 (2): 147–64. <https://doi.org/10.1097/00006842-197903000-00008>.
- Ryan, G. B., and G. Majno. 1977. 'Acute Inflammation. A Review'. *The American Journal of Pathology* 86 (1): 183–276.
- Saeed, Rubina W., Santosh Varma, Tina Peng-Nemeroff, Barbara Sherry, David Balakhaneh, Jared Huston, Kevin J. Tracey, Yousef Al-Abed, and Christine N. Metz. 2005. 'Cholinergic Stimulation Blocks Endothelial Cell Activation and Leukocyte Recruitment during Inflammation'. *The Journal of Experimental Medicine* 201 (7): 1113–23. <https://doi.org/10.1084/jem.20040463>.
- Shiflett, Michael W., Alexander Z. Rankin, Michelle L. Tomaszynski, and Timothy J. DeVoogd. 2004. 'Cannabinoid Inhibition Improves Memory in Food-Storing Birds, but with a Cost'. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 271 (1552): 2043–48. <https://doi.org/10.1098/rspb.2004.2823>.
- Shultz, Allison J, and Timothy B Sackton. 2019. 'Immune Genes Are Hotspots of Shared Positive Selection across Birds and Mammals'. *ELife* 8 (January): e41815. <https://doi.org/10.7554/eLife.41815>.
- Silverman, Marni N., and Esther M. Sternberg. 2012. 'Glucocorticoid Regulation of Inflammation and Its Functional Correlates: From HPA Axis to Glucocorticoid Receptor Dysfunction: Glucocorticoid Resistance in Inflammatory Disease'. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1261 (1): 55–63. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06633.x>.
- Smith, R. S., T. J. Smith, T. M. Blieden, and R. P. Phipps. 1997. 'Fibroblasts as Sentinel Cells. Synthesis of Chemokines and Regulation of Inflammation'. *The American Journal of Pathology* 151 (2): 317–22.

- Soderstrom, K., and F. Johnson. 2000. 'CB1 Cannabinoid Receptor Expression in Brain Regions Associated with Zebra Finch Song Control'. *Brain Research* 857 (1–2): 151–57.
- Soderstrom, Ken, and Frank Johnson. 2003. 'Cannabinoid Exposure Alters Learning of Zebra Finch Vocal Patterns'. *Brain Research. Developmental Brain Research* 142 (2): 215–17.
- Soderstrom, Ken, and Qiyu Tian. 2006. 'Developmental Pattern of CB1 Cannabinoid Receptor Immunoreactivity in Brain Regions Important to Zebra Finch (*Taeniopygia guttata*) Song Learning and Control'. *The Journal of Comparative Neurology* 496 (5): 739–58. <https://doi.org/10.1002/cne.20963>.
- Steiner, H., T. I. Bonner, A. M. Zimmer, S. T. Kitai, and A. Zimmer. 1999. 'Altered Gene Expression in Striatal Projection Neurons in CB1 Cannabinoid Receptor Knockout Mice'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (10): 5786–90.
- Stincic, Todd L., and Richard L. Hyson. 2008. 'Localization of CB1 Cannabinoid Receptor mRNA in the Brain of the Chick (*Gallus Domesticus*)'. *Brain Research* 1245 (December): 61–73. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.09.037>.
- Tsou, K, S Brown, M.C Sañudo-Peña, K Mackie, and J.M Walker. 1998. 'Immunohistochemical Distribution of Cannabinoid CB1 Receptors in the Rat Central Nervous System'. *Neuroscience* 83 (2): 393–411. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(97\)00436-3](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(97)00436-3).
- Vagnerová, Karla, Martin Vodička, Petra Hermanová, Peter Ergang, Dagmar Šrůtková, Petra Klusoňová, Kateřina Balounová, Tomáš Hudcovic, and Jiří Pácha. 2019. 'Interactions Between Gut Microbiota and Acute Restraint Stress in Peripheral Structures of the Hypothalamic–Pituitary–Adrenal Axis and the Intestine of Male Mice'. *Frontiers in Immunology* 10 (November). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02655>.
- Vanner, Stephen J., Beverley Greenwood-Van Meerveld, Gary M. Mawe, Terez Shea-Donohue, Elena F. Verdu, Jackie Wood, and David Grundy. 2016. 'Fundamentals of Neurogastroenterology: Basic Science'. *Gastroenterology* 150 (6): 1280–91. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.02.018>.
- Vincent, L., D. Vang, J. Nguyen, B. Benson, J. Lei, and K. Gupta. 2016. 'Cannabinoid Receptor-Specific Mechanisms to Alleviate Pain in Sickle Cell Anemia via Inhibition of Mast Cell Activation and Neurogenic Inflammation'. *Haematologica* 101 (5): 566–77. <https://doi.org/10.3324/haematol.2015.136523>.

- Vinkler, Michal, Ariel E. Leon, Laila Kirkpatrick, Rami A. Dalloul, and Dana M. Hawley. 2018. 'Differing House Finch Cytokine Expression Responses to Original and Evolved Isolates of *Mycoplasma Gallisepticum*'. *Frontiers in Immunology* 9 (January). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00013>.
- Watkins, Linda R., Steven F. Maier, and Lisa E. Goehler. 1995. 'Cytokine-to-Brain Communication: A Review & Analysis of Alternative Mechanisms'. *Life Sciences* 57 (11): 1011–26. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(95\)02047-M](https://doi.org/10.1016/0024-3205(95)02047-M).
- Werman, A., R. Werman-Venkert, R. White, J.-K. Lee, B. Werman, Y. Krelin, E. Voronov, C. A. Dinarello, and R. N. Apte. 2004. 'The Precursor Form of IL-1 Is an Intracrine Proinflammatory Activator of Transcription'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (8): 2434–39. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308705101>.

9. Přílohy

Tabulka č. 20.: Plný model závislosti exprese *IL-1 β* v mozku papoušků

lm(formula = logQst ~ Stimulace + Pohlaví + Druh + Várka)

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	0.13379	0.43832	0.305	0.76294
StimulaceBr LPS	0.52918	0.16570	3.194	0.00404 **
PohlavíM	-0.31393	0.18446	-1.702	0.10226
DruhForpus coelestis	0.35988	0.40030	0.899	0.37796
DruhMelopsittacus undulatus	0.24175	0.40565	0.596	0.55703
DruhNeophema elegans	0.31473	0.41302	0.762	0.45379
DruhNymphicus hollandicus	0.28406	0.40169	0.707	0.48656
DruhPsephotus haematonotus	-0.05321	0.40169	-0.132	0.89577
Várka	-0.41421	0.18285	-2.265	0.03322 *

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.4661 on 23 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.4841, Adjusted R-squared: 0.3047

F-statistic: 2.698 on 8 and 23 DF, p-value: 0.02975

Tabulka č. 21.: Plný model závislosti exprese *IL-1 β* ve střevě papoušků

lm(formula = logQst ~ Stimulace + Pohlaví + Druh + Várka)

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	-0.61687	0.23164	-2.663	0.01390 *
StimulaceLPS	0.61022	0.08757	6.969	4.2e-07 ***
PohlavíM	0.08826	0.09748	0.905	0.37466
DruhForpus coelestis	0.71536	0.21155	3.382	0.00257 **
DruhMelopsittacus undulatus	0.17269	0.21438	0.806	0.42876
DruhNeophema elegans	0.43066	0.21827	1.973	0.06063
DruhNymphicus hollandicus	0.15610	0.21228	0.735	0.46957
DruhPsephotus haematonotus	0.13263	0.21228	0.625	0.53827
Várka	-0.34259	0.09663	-3.545	0.00173 **

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.2463 on 23 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.8016, Adjusted R-squared: 0.7325

F-statistic: 11.61 on 8 and 23 DF, p-value: 1.866e-06

Tabulka č. 22.: Plný model závislosti exprese *IL-1 β* v kůži papoušků

lm(formula = logQst ~ Stimulace + Pohlaví + Druh + Várka)

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	-1.63039	1.05851	-1.540	0.13714
StimulaceLPS	1.13468	0.40014	2.836	0.00937 *
PohlavíM	0.17010	0.44546	0.382	0.70607
DruhForpus coelestis	0.04323	0.96668	0.045	0.96472
DruhMelopsittacus undulatus	0.56531	0.97961	0.577	0.56950
DruhNeophema elegans	0.86266	0.99741	0.865	0.39602
DruhNymphicus hollandicus	0.47369	0.97003	0.488	0.62995
DruhPsephotus haematonotus	0.20373	0.97003	0.210	0.83550
Várka	0.08110	0.44156	0.184	0.85589

* signifikantní; ** marginálně signifikantní

Residual standard error: 1.126 on 23 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.3016, Adjusted R-squared: 0.05873

F-statistic: 1.242 on 8 and 23 DF, p-value: 0.3202

Tabulka č. 23.: Plný model závislosti exprese *CNR1* v mozku papoušků

lm(formula = logQst ~ Stimulace + Pohlaví + Druh + Várka)

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	0.5688	0.2889	1.969	0.0611 **
StimulaceLPS	0.1192	0.1092	1.092	0.2862
PohlavíM	0.2195	0.1216	1.805	0.0842 **
DruhForpus coelestis	-0.4174	0.2638	-1.582	0.1273
DruhMelopsittacus undulatus	-0.5134	0.2674	-1.920	0.0673
DruhNeophema elegans	-0.6267	0.2722	-2.302	0.0307 *
DruhNymphicus hollandicus	-0.4897	0.2647	-1.850	0.0772 **
DruhPsephotus haematonotus	-0.1709	0.2647	-0.646	0.5249
Várka	-0.1888	0.1205	-1.566	0.1310

* signifikantní; ** marginálně signifikantní

Residual standard error: 0.3072 on 23 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.5258, Adjusted R-squared: 0.3609

F-statistic: 3.188 on 8 and 23 DF, p-value: 0.01388

Tabulka č. 24.: Plný model závislosti exprese *CNR1* ve střevě papoušků

lm(formula = logQst ~ Stimulace + Pohlaví + Druh + Várka)

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	0.40815	0.76162	0.536	0.5972
StimulaceLPS	0.18302	0.28791	0.636	0.5312
PohlavíM	0.63157	0.32051	1.970	0.0609 **
DruhForpus coelestis	-0.30466	0.69554	-0.438	0.6655
DruhMelopsittacus undulatus	-1.34321	0.70485	-1.906	0.0693 **
DruhNeophema elegans	0.06578	0.71765	0.092	0.9278
DruhNymphicus hollandicus	-0.43814	0.69795	-0.628	0.5364
DruhPsephotus haematonotus	0.01317	0.69795	0.019	0.9851
Várka	-0.46351	0.31771	-1.459	0.1581

* signifikantní; ** marginálně signifikantní

Residual standard error: 0.8098 on 23 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.4324, Adjusted R-squared: 0.2349

F-statistic: 2.19 on 8 and 23 DF, p-value: 0.06766

Tabulka č. 25.: Plný model závislosti exprese *CNR1* v kůži papoušků

lm(formula = logQst ~ Stimulace + Pohlaví + Druh + Várka)

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	-0.85966	1.00773	-0.853	0.402
StimulaceLPS	-0.55662	0.38094	-1.461	0.157
PohlavíM	-0.05277	0.42409	-0.124	0.902
DruhForpus coelestis	1.10987	0.92030	1.206	0.240
DruhMelopsittacus undulatus	0.64620	0.93261	0.693	0.495
DruhNeophema elegans	1.42070	0.94956	1.496	0.148
DruhNymphicus hollandicus	-0.17892	0.92350	-0.194	0.848
DruhPsephotus haematonotus	0.67431	0.92350	0.730	0.473
Várka	0.12558	0.42037	0.299	0.768

Residual standard error: 1.072 on 23 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.3267, Adjusted R-squared: 0.09249

F-statistic: 1.395 on 8 and 23 DF, p-value: 0.2508

Tabulka č. 26.: Plný model závislosti exprese *IL-1 β* u zebřiček

lm(formula = logQst ~ Stimulace + Tkáň)

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	-0.5437	0.1950	-2.788	0.00665 *
StimulaceLPS	0.5202	0.1950	2.667	0.00928 *
TkáňSk-L	1.6604	0.3084	5.384	7.28e-07 *
TkáňSk-R	0.4648	0.2389	1.946	0.05524 **
TkáňSp	1.1112	0.2389	4.652	1.30e-05 *

* signifikantní; ** marginálně signifikantní

Residual standard error: 0.8275 on 79 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.4241, Adjusted R-squared: 0.395

F-statistic: 14.55 on 4 and 79 DF, p-value: 6.06e-09

Tabulka č. 27.: Plný model závislosti exprese *CNR1* u zebřiček

lm(formula = logQst ~ Stimulace + Tkáň)

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	0.9927	0.1705	5.824	1.19e-07 *
StimulaceLPS	-0.1730	0.1705	-1.015	0.313
TkáňSk-L	-1.2300	0.2695	-4.564	1.82e-05 *
TkáňSk-R	-1.0730	0.2088	-5.140	1.94e-06 *
TkáňSp	-2.3963	0.2088	-11.478	< 2e-16 *

* signifikantní; ** marginálně signifikantní

Residual standard error: 0.7232 on 79 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.6287, Adjusted R-squared: 0.6099

F-statistic: 33.44 on 4 and 79 DF, p-value: 2.608e-16

Tabulka č. 28.: Plný model závislosti exprese *CNR2* u zebřiček

lm(formula = logQst ~ Stimulace + Tkáň)

Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-2.32256	-0.54615	0.08033	0.63578	1.97464

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	-0.1686	0.2015	-0.837	0.405275
StimulaceLPS	-0.3859	0.2015	-1.915	0.059124 **
TkáňSk-L	1.1163	0.3186	3.503	0.000760 *
TkáňSk-R	0.7159	0.2468	2.900	0.004825 *
TkáňSp	0.8852	0.2468	3.587	0.000579 *

* signifikantní; ** marginálně signifikantní

Residual standard error: 0.855 on 79 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.2044, Adjusted R-squared: 0.1642

F-statistic: 5.075 on 4 and 79 DF, p-value: 0.001083